

UNIVERSITE DE NANTES

FACULTE DE MEDECINE

# Caractérisation des anticorps allo-immuns et anti-HLA en transplantation rénale : étude de leur rôle sur le devenir du greffon

THESE DE DOCTORAT

Ecole Doctorale BIOLOGIE SANTE

Discipline SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE

Spécialité IMMUNOLOGIE

Présentée et soutenue publiquement par

**Sandrine Le Roux**

Le 08 octobre 2010, devant le jury ci-dessous

Professeur Gilles Blancho	Président
Professeur Emmanuel Morelon	Rapporteur
Professeur Christophe Legendre	Rapporteur
Docteur Caroline Suberbielle	Examinateur
Professeur Maryvonne Hourmant	Co-encadrante de thèse
Docteur Jean Harb	Directeur de thèse

« Ne me dites pas que ce problème est difficile.  
S'il n'était pas difficile, ce ne serait pas un problème. »

Ferdinand Foch

# Table des matières

<b>TABLE DES ILLUSTRATIONS .....</b>	<b>5</b>
<b>TABLE DES ABREVIATIONS .....</b>	<b>6</b>
<b>INTRODUCTION .....</b>	<b>7</b>
LA TRANSPLANTATION RENALE .....	8
I- <i>Principe de la transplantation.....</i>	8
II- <i>Chiffres et enjeux .....</i>	8
III- <i>Evolution des traitements immunosuppresseurs .....</i>	10
1- Les inhibiteurs de la calcineurine .....	10
2- Les inhibiteurs de purines .....	10
3- Le Sirolimus .....	11
4- Les anticorps anti-lymphocytaires .....	11
IV- <i>Diminution de l'incidence des rejets aigus, mais pas des rejets chroniques .....</i>	12
LES ANTICORPS ANTI-HLA EN TRANSPLANTATION.....	14
I- <i>Le système HLA .....</i>	14
1- Les molécules HLA de classe I et de classe II classiques .....	14
2- Les autres molécules du système HLA.....	16
II- <i>Rôle du système HLA en immunologie .....</i>	17
III- <i>Le système HLA en transplantation.....</i>	17
1- Réponse humorale de l'hôte contre son greffon .....	17
2- Immunisation des patients .....	18
IV- <i>Détection et monitoring des anticorps anti-HLA DSA.....</i>	19
1- Tests de compatibilité (Crossmatch) .....	19
2- Détection et suivi des anticorps anti-HLA chez les patients transplantés.....	20
V- <i>Rôle délétère des anticorps anti-HLA en transplantation .....</i>	21
VI- <i>Isotypes des anticorps anti-HLA .....</i>	22
1- Classes d'immunoglobulines en transplantation .....	22
2- Isotypes d'IgG.....	23
L'AUTO-IMMUNITÉ .....	26
I- <i>La tolérance B .....</i>	26
1- L'élimination dans les tissus lymphoïdes périphériques.....	26
2- L'anergie .....	27
3- Elimination dépendante des lymphocytes T par la voie de Fas/FasL .....	27
4- Elimination dans les centres germinatifs .....	27
II- <i>Rupture de tolérance et auto-immunité .....</i>	28
LE REJET CHRONIQUE.....	30
I- <i>Evolution de la définition du rejet chronique : la classification de Banff .....</i>	30
1- 1 <sup>ère</sup> conférence de Banff : mise en place de la classification.....	30
2- 4 <sup>ème</sup> conférence de Banff: Définitions histologiques .....	31
3- 8 <sup>ème</sup> conférence de Banff: Fibrose Interstitielle et Atrophie Tubulaire .....	33
4- 9 <sup>ème</sup> conférence de Banff : Précisions sur le C4d.....	34
5- 10 <sup>ème</sup> conférence de Banff : Rejet à médiation humorale .....	35
II- <i>Le rejet chronique humorale actif .....</i>	36
1- Définition de l'AMR chronique actif .....	36
2- Anticorps anti-HLA.....	37
a- La Théorie humorale de la Transplantation.....	37
b- Anticorps préformés et de novo.....	38

c-	Isotypes et glycosylation d'anticorps .....	38
d-	Classe et influence des molécules HLA ciblées .....	40
e-	La notion d'épitopes .....	41
f-	Anticorps anti-MICA et non HLA.....	41
g-	Notion d'accommodation .....	42
3-	Les dépôts de C4d .....	42
a-	La voie classique du complément.....	42
b-	Marquage et détection du C4d.....	44
c-	Corrélations C4d et AMR chronique actif .....	45
d-	Les autres composants de la voie classique du complément.....	46
<i>III-</i>	<i>La fibrose interstitielle et atrophie tubulaire .....</i>	46
1-	Définition de la Fibrose Interstitielle et Atrophie Tubulaire .....	46
2-	Difficultés d'évaluation de la fibrose.....	47
3-	Facteurs fibrosants.....	47
4-	La théorie de la transition épithéliomésenchymateuse (EMT).....	49
CHRONOLOGIE ET BIOMARQUEURS DU REJET CHRONIQUE.....		51
<i>I-</i>	<i>Les biopsies protocolaires : indicateurs du déroulement d'un rejet de greffe.....</i>	51
1-	Bénéfices / Risques des biopsies protocolaires .....	51
2-	Le rejet infraclinique .....	52
3-	Chronologie de la GT.....	53
4-	Fréquence de la fibrose .....	54
<i>II-</i>	<i>Les biomarqueurs en transplantation rénale .....</i>	56
1-	La recherche de biomarqueurs urinaires .....	56
2-	Génomique et biomarqueurs.....	57
3-	Protéomique et biomarqueurs .....	58
<b>PROJET DE RECHERCHE .....</b>		<b>60</b>
<b>RESULTATS .....</b>		<b>63</b>
MANUSCRIT #1: DEVELOPMENT OF ANTI-HLA CLASS II DONOR-SPECIFIC ANTIBODIES AFTER KIDNEY TRANSPLANTATION: IS DETERMINATION OF IGG SUBTYPES USEFUL IN THE MANAGEMENT OF KIDNEY TRANSPLANTATION? .....		64
MANUSCRIT #2: BIOMARKERS FOR THE DIAGNOSIS OF THE STABLE KIDNEY TRANSPLANT AND CHRONIC TRANSPLANT INJURY USING THE PROTOARRAY <sup>®</sup> TECHNOLOGY .....		86
RÉSULTATS SUPPLÉMENTAIRES : RÉSULTATS PRÉLIMINAIRES DE VALIDATION DES BIOMARQUEURS .....		112
I-	ROLE DES SOUS-CLASSES D'IGG ANTI-HLA DE CLASSE II DANS LE REJET CHRONIQUE .....	116
II-	RECHERCHE DE BIOMARQUEURS POUR LE DIAGNOSTIC DES DIFFERENTES FORMES DU REJET CHRONIQUE	
	120	
<b>CONCLUSIONS - PERSPECTIVES .....</b>		<b>125</b>
<b>ANNEXES .....</b>		<b>128</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE .....</b>		<b>193</b>

# Table des illustrations

## Figures

FIGURE 1: SURVIE GLOBALE DU GREFFON RENAL DE GREFFES EFFECTUEES ENTRE 1993 ET 2007 (ABM BILAN 2008) .....	9
FIGURE 2: MODE D'ACTION DES PRINCIPAUX TRAITEMENTS IMMUNOSUPPRESSEURS .....	13
FIGURE 3: LES MOLECULES HLA DE CLASSE I ET DE CLASSE II.....	15
FIGURE 4: CARTE PHYSIQUE SIMPLIFIEE DE LA REGION CHROMOSOMIQUE HLA (NARINDER K. MEHRA AND GURVINDER KAUR).....	16
FIGURE 5: CARACTERISTIQUES DE LA GT.....	37
FIGURE 6: STRUCTURE ET GLYCOSYLATION DES IMMUNOGLOBULINES (PAUL J CARTER 2006) .....	40
FIGURE 7: ACTIVATION ET REGULATION DE LA VOIE CLASSIQUE DU COMPLEMENT (WILLIAM M BALDWIN ET AL. 2004) .....	43
FIGURE 8: REJET AIGU DE TYPE AMR, TCMR OU MIXTE (V NICKELEIT ET ANDREONI 2007) .....	45
FIGURE 9: DEROULEMENT DE LA TRANSITION EPITHELIOMESENCHYMATEUSE (CORNaire ET AL. 2010).....	50
FIGURE 10: SYNTHESE DES FACTEURS CONTRIBUANT A LA PROGRESSION DES PATHOLOGIES RENALES (SCHLONDORFF 2008).....	55

## TABLEAUX

TABLEAU 1:PRINCIPALES CARACTERISTIQUES DES 4 ISOTYPES D'IGG (SALFELD 2007) .....	24
TABLEAU 2:NOMENCLATURE DES FACTEURS AIGUS ET CHRONIQUES .....	31
TABLEAU 3 : CRITERES QUANTITATIFS DE LA GLOMERULOPATHIE DU TRANSPLANT ("CG") .....	32
TABLEAU 4: PROPOSITION DE CRITERE QUANTITATIF POUR LE SCORE DE LA MARGINATION DES CELLULES INFLAMMATOIRES DANS LES CAPILLAIRE PERITUBULAIRES.....	33

# Table des abréviations

AMR	Antibody-Mediated Rejection
ATG	Anti-Thymocyte Globulins
CAN	Chronic Allograft Nephropathy
CCTT	Collaborative Clinical Trials in Transplantation
CDC	Complement Dependent Cytotoxicity
CMH	Complexe Majeur d'Histocompatibilité
CsA	Cyclosporine A
CTGF	Connective Tissue Growth Factor
DSA	Donor Specific Antibody
DTT	DiThiThreitol
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbant Assay
EMT	Epithelial to Mesenchymal Transition
FIAT	Fibrose Interstitielle et Atrophie Tubulaire
FKBP-12	FK Binding Protein 12
GA	Glomérulopathie d'Allogreffe
GT	Glomérulopathie du Transplant
HLA	Human Leukocyte Antigen
IgG	Immunoglobulin G
IgM	Immunoglobulin M
IVIg	IntraVeinous Immunoglobulin G
KAT1	K alpha Tubulin 1
LCT	LymphoCytoToxicity
MAPK	Mitogen Activated Protein Kinase
MFI	Mean Fluorescence Intensity
MIC	MHC class I related Chain
MICA	MHC class I polypeptide related sequence A
MMF	Mycophénolate Mofetil
mTOR	mammalian Target of Rapamycin
PRA	Panel Reactive antibody
PTC	PeriTubular Capillary
ptc	peritubular capillaritis
RAD	Rapamycin Derivated
RAG	Recombinant Activating Gene
SELDI	Surface Enhanced Laser Desorption and Ionisation
TCMR	T Cell Mediated Rejection
TGF $\beta$	Tumor Growth Factor beta
TLR	Toll-like Receptor
TNF $\alpha$	Tumor Necrosis Factor alpha

## **Introduction**

# **La transplantation rénale**

## **I- Principe de la transplantation**

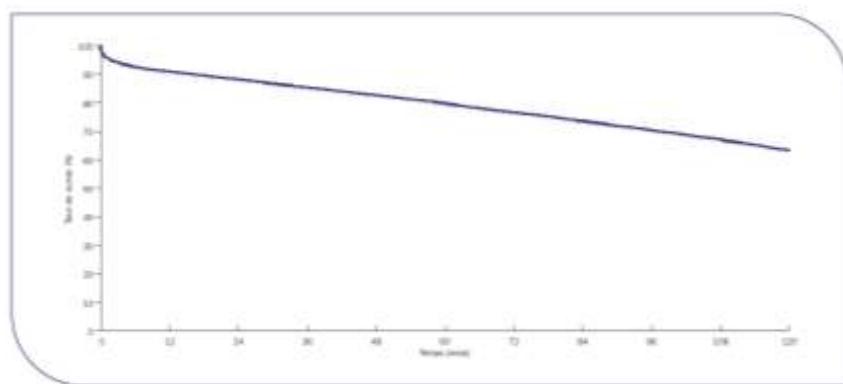
La transplantation rénale consiste à remplacer le rein défaillant d'un patient par un rein fonctionnel prélevé chez un donneur dans le but de restaurer une fonction rénale normale. Deux types de donneurs sont principalement utilisés : les donneurs vivants, personnes volontaires compatibles ayant un lien de parenté ou étant affectivement liés (loi de Bioétique modifiée en 2004) avec le patient, et les donneurs décédés en état de mort encéphalique. Depuis 2006, les greffons peuvent également être prélevés sur une troisième catégorie de donneurs, à savoir les donneurs décédés après arrêt cardiaque.

## **II- Chiffres et enjeux**

Selon les chiffres de l'Organisation Mondiale de la Santé, en 2008, 66 337 transplantations rénales ont été réalisées dans le monde, dont 29 984 à partir de donneurs vivants et 36 353 à partir de donneurs décédés. Sur son bilan des activités de prélèvement et de greffe en France en 2008, l'Agence de Biomédecine recense 2 937 nouvelles greffes rénales cette même année. 3 671 personnes ont été inscrites sur la liste nationale d'attente, ce qui représente une progression de 4 % par rapport à l'année 2007, chiffre qui augmente encore en 2009 avec une progression de 5,4% par rapport à 2008. En attendant d'être greffées, ces personnes sont dialysées régulièrement pour pallier à leur insuffisance rénale chronique. L'étude réalisée par Benain et al (Benain et al. 2007) sur le coût de la prise en charge de la dialyse en France pour l'année 2005, estime que le montant total d'une année de dialyse, incluant les frais de déplacement vers les centres de soins, les frais de personnels médicaux, de la pose de la voie d'abord, des médicaments et tous les autres facteurs directement inhérents à la dialyse, s'échelonne entre 49 676 et 81 449€ par patient selon le type de dialyse retenu. Ce qui représente une dépense annuelle de 2,145 milliards d'euros soit 1,56% des dépenses d'assurance maladie. Le coût global d'une transplantation rénale quant à lui, est estimé pour la première année aux alentours de 33 000€ par patient, comprenant un séjour initial d'hospitalisation d'environ 20 000€ pour une vingtaine de jours et un traitement immunosuppresseur annuel autour de 13 000€ (chiffres extraits de l'article n°468

du 09/05/2004, du site web.reseau-chu.org). La première année de transplantation a de ce fait un coût équivalent à une année de dialyse, mais ce coût décroît par la suite et rend la greffe rénale moins onéreuse à long terme que l'épuration extra-corporelle.

Toujours selon l'Agence de Biomédecine, la survie globale du greffon rénal pour les greffes effectuées entre 1993 et 2007 est de 91,1% à un an, elle passe à 79,8% à 5 ans et diminue à 63,4% à dix ans (Figure 1).



**Figure 1: survie globale du greffon rénal de greffes effectuées entre 1993 et 2007 (ABM bilan 2008)**

Survie, en mois, de greffes effectuées entre 1993 et 2007 en France. La survie à un an post-greffe dépasse 90%, cependant 36,6% des greffons sont perdus dans les dix ans suivant la greffe.

Si l'on ne s'intéresse qu'aux greffes les plus récentes, sur la période de 2000 à 2004 les survies à un et cinq ans sont de 92% et 80,4% respectivement. Seule la survie à un an est disponible pour l'intervalle de 2005 à 2007, elle s'élève à 92,8%.

La transplantation rénale constitue donc une alternative moins contraignante pour le patient dans sa vie de tous les jours. De même, la transplantation augmente significativement la survie des patients par rapport à la dialyse (Chalem et al. 2005), c'est pourquoi il est préférable de transplanter un patient âgé même si la qualité du greffon n'est pas optimale (Savoye et al. 2007), et le taux de survie des greffons dépasse les 90% douze mois après la greffe. Cette très bonne survie des greffons à un an s'explique en grande partie par les progrès réalisés dans le domaine des traitements immunosuppresseurs. Enfin, sur le plan économique, la transplantation est moins onéreuse pour la société que le coût de la dialyse.

### **III- Evolution des traitements immunosuppresseurs**

#### **1- Les inhibiteurs de la calcineurine**

Dès le début des années 1980, l'introduction du Sandimmum a permis d'accroître la survie des greffons par rapport aux traitements déjà utilisés à l'époque, les Corticoïdes et l'Azathioprine. La Cyclosporine A (CsA), est une molécule qui se fixe à son transporteur cytoplasmique, la cyclophiline, et ainsi inhibe la calcineurine, qui ne peut plus activer les promoteurs de la transcription des cytokines telles que l'interleukine-2 ou l'interféron-gamma (Figure 2). La cyclophiline est également impliquée dans la voie des Mitogen-Activated Protein Kinases (MAPK) et du facteur de transcription Necrosis Factor kappa B (NFkB). Les données pharmaco-cinétiques montrent une grande variabilité inter et intra-individuelle. Une seconde forme de CsA a été développée un peu plus tard, une micro-émulsion, le Néoral, dont la biodisponibilité est bien meilleure. L'étude réalisée par Shah et al (Shah et al. 1999) compile les données de 46 publications référencées dans Pubmed sur l'utilisation du Néoral vs Sandimmum en transplantation rénale, hépatique et cardiaque. Cette étude conclut que le Néoral atteint une efficacité similaire à celle du Sandimum. Le Tacrolimus (FK506) est également un membre de la famille des inhibiteurs de la calcineurine. Il se fixe sur un transporteur différent, la FKBP-12 (pour FK binding protein 12) (Figure 2). Plusieurs études ont comparé l'efficacité de la Cyclosporine A et du Tacrolimus, en se basant principalement sur la survenue de rejets, la survie des greffons et l'incidence d'effets indésirables à court terme chez les patients traités. Mayer et al (Mayer et al. 1997) ont notamment montré qu'à 12 mois post-greffe, les patients traités par Tacrolimus ont développé moins de rejets que les patients traités par Sandimmum. Les survies ont été équivalentes dans les deux groupes, de même que l'incidence des effets secondaires, bien qu'ils soient différents suivant la molécule utilisée. Ces effets secondaires comprennent de l'hypertension, une dyslipidémie, une néphrotoxicité pouvant inclure de la fibrose interstitielle, de l'atrophie tubulaire et de la hyalinose de la paroi artériolaire.

#### **2- Les inhibiteurs de purines**

La CsA ou le Tacrolimus constituent une première ligne d'immunosuppression et sont associés à d'autres molécules dont les cibles et voies d'action sont différentes. On y trouve les inhibiteurs de purines, notamment l'Azathioprine et plus récemment le Mycophénolate Mofetil (MMF). Ce dernier inhibe la prolifération des lymphocytes T, lymphocytes B et monocytes en bloquant l'enzyme impliquée dans la synthèse de novo des purines (Figure 2).

Le MMF, en association avec la CsA ou le FK-506 et des corticostéroïdes réduit significativement la survenue d'épisodes de rejet par rapport à l'Azathioprine, avec une survie du greffon identique et une meilleure fonction rénale à un an (Halloran et al. 1997), (Vanrenterghem et al. 1998).

### **3- Le Sirolimus**

De la même façon que le tacrolimus, le Sirolimus se lie à la FKBP-12, mais sur un site différent. Le sirolimus inhibe la protéine mTOR (mammalian target of rapamycin), impliquée dans la prolifération induite par des cytokines (Figure 2). Le Sirolimus a des avantages majeurs par rapport aux immunosuppresseurs cités précédemment car il est dépourvu d'effet néphrotoxique et inhibe la prolifération de différents types cellulaires, propriété qui lui confère un effet de protection vis-à-vis du cancer. Il a cependant une durée de demi-vie très longue, ainsi qu'une incidence d'effets secondaires élevée. L'hypercholestérolémie, des thrombopénies, leukopénies, pneumonies interstitielles sont des exemples des effets secondaires provoqués par le sirolimus. Cette molécule a été modifiée chimiquement pour donner le RAD (rapamycine derived) qui a les mêmes propriétés que le Sirolimus, mais une durée de vie raccourcie.

### **4- Les anticorps anti-lymphocytaires**

Les anticorps immunsupresseurs sont utilisés en traitement d'induction, c'est-à-dire dans les premiers jours suivant la greffe, et dans le traitement curatif du rejet aigu cortico-résistant. Ces anticorps ont pour effet de dépléter le sang circulant en lymphocytes, soit par cytolysé, soit par opsonisation. L'OKT3 est un anticorps monoclonal de souris dirigé contre le CD3 des lymphocytes T (Figure 2). L'ATG (anti-thymocyte globulins) est une globuline polyclonale obtenue en immunisant des lapins ou des chevaux avec des lymphocytes humains. L'utilisation de ces anticorps permet de réduire l'incidence des rejets aigus chez des patients transplantés rénaux (Shield et al. 1997), cependant l'OKT3 peut entraîner une immunisation du patient suite à la première injection. De plus, la fixation de ces anticorps sur les récepteurs des lymphocytes les active, de ce fait des cytokines peuvent être produites.

D'autres anticorps monoclonaux ciblent les récepteurs à l'interleukine 2. Ces anticorps, le Daclizumab et le Basiliximab, sont plus spécifiques que l'OKT3 et l'ATG car ils se fixent à la chaîne  $\alpha$  du récepteur à l'IL2, qui n'est présente que sur les lymphocytes T activés et qui n'est pas capable de transduire de signal d'activation (Figure 2). De plus, ces anticorps sont

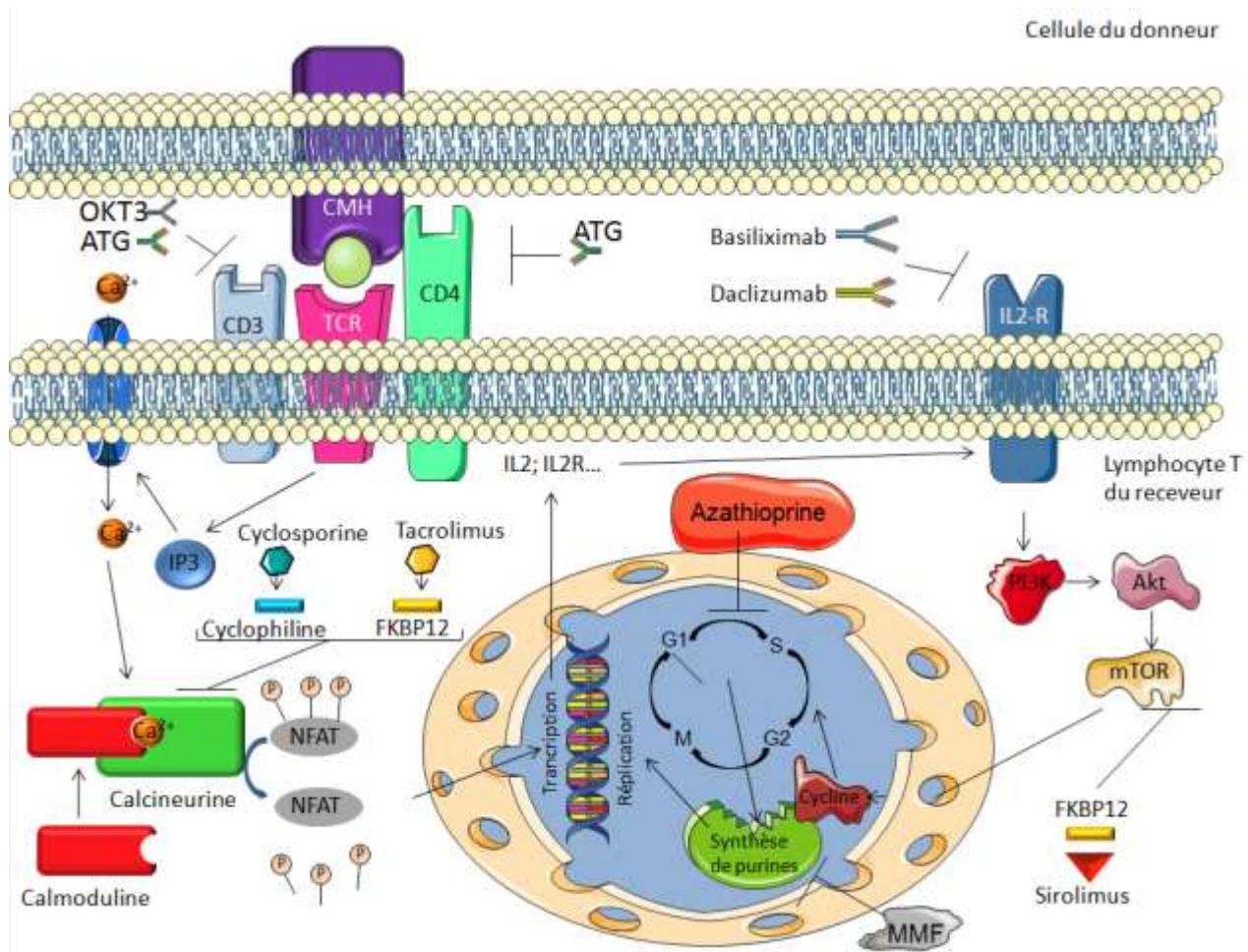
chimériques ou humanisés, et n'entraînent donc pas de sensibilisation chez le receveur. Ils sont alors capables de réduire l'incidence de rejet aigu suite à la greffe (Kahan et al. 1999) sans toutefois entraîner de toxicité ou d'effet secondaire délétère.

#### **IV- Diminution de l'incidence des rejets aigus, mais pas des rejets chroniques**

Les traitements immunsupresseurs actuels combinent la plupart du temps un inhibiteur de la calcineurine, un inhibiteur de purines et des corticostéroïdes, avec ou sans traitement d'induction par les anticorps anti-lymphocytaires. L'utilisation de plusieurs immunsupresseurs ciblant des molécules différentes permet d'augmenter l'efficacité du traitement en bloquant à différents niveaux l'action des lymphocytes du receveur (Figure 2). Les progrès réalisés dans ce domaine ont permis de réduire fortement l'incidence de rejets hyper-aigus et aigus chez les patients transplantés rénaux.

Toutefois, la plupart des études réalisées au moment de l'apparition des nouvelles molécules immunsuppressives se sont efforcées de démontrer leur supériorité vis-à-vis de leurs prédecesseurs, en se limitant généralement à une période d'un an. Cependant, ces traitements sont moins efficaces, directement du moins, dans la prévention du rejet chronique.

De plus, dans environ 5% des cas, des anticorps dirigés contre les molécules Human Leukocyte Antigen (HLA) portées par le greffon sont détectés post-greffe dans le sérum des patients transplantés. La présence de ces anticorps anti-HLA est également corrélée avec la dégradation de la fonction rénale et un risque accru de perte du greffon (Hourmant et al. 2005).



**Figure 2: Mode d'action des principaux traitements immunosuppresseurs**

Les inhibiteurs de la calcineurine comprennent la Cyclosporine A et le Tacrolimus, qui se fixent à leurs transporteurs respectifs, la cyclophiline ou la FKBP12. L'ensemble inhibe ainsi la calcineurine impliquée dans l'activation de promoteurs de transcription. Ceci empêche la synthèse de cytokines nécessaires à la prolifération lymphocytaire. Le Sirolimus inhibe également la prolifération cellulaire en se liant à la FKBP12 et en bloquant la protéine mTOR impliquée dans la voie du cycle cellulaire. Le Mycophénolate Mofetil et l'Azathioprine bloquent la synthèse des purines et empêchent ainsi les lymphocytes de proliférer. Les anticorps ATG et OKT3 déplètent les lymphocytes circulants par cytolysé ou opsonisation. Les anticorps anti IL-2R bloquent le CD25 et empêche la prolifération lymphocytaire induite par l'IL-2.

# **Les anticorps anti-HLA en transplantation**

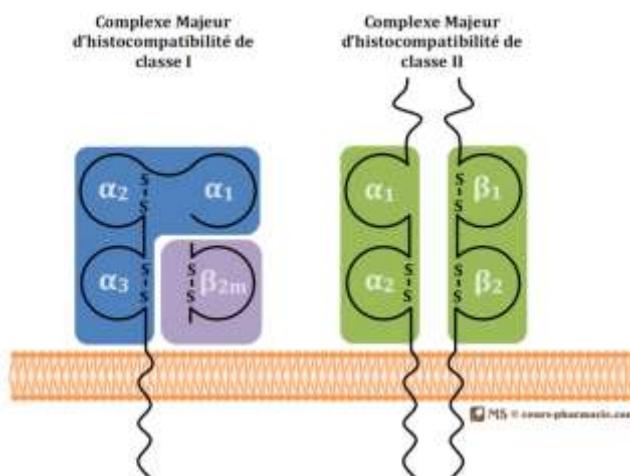
## **I- Le système HLA**

Le système du Complexe Majeur d'Histocompatibilité (CMH) ou Human Leukocyte Antigen (HLA) est un système de présentation d'antigène qui est exprimé par la quasi-totalité des cellules d'un organisme. Il constitue un système génique complexe et très polymorphe qui définit la carte d'identité d'un individu. Chez l'homme, l'ensemble des gènes codant pour les molécules du système HLA sont localisés sur le bras court du chromosome 6 et sont transmis en bloc, c'est-à-dire par haplotypes entiers, des parents aux enfants. Ils sont regroupés en classes suivant leur structure, leur fonction et leur localisation. Les premières molécules HLA ont été découvertes dès 1952 par Jean Dausset.

### **1- Les molécules HLA de classe I et de classe II classiques**

Les molécules de classe I dites classiques sont codées par les gènes HLA-A, -B et -C. Elles sont constituées de trois sous-unités extra-membranaires de chaîne alpha ( $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$  et  $\alpha_3$ ) qui comprennent des régions hypervariables dans les exons 2 et 3, associées à une molécule de bêta-2-microglobuline (Figure 3) (Bjorkman et al. 2005). Ces molécules ont une distribution tissulaire très large avec une expression moindre pour le gène C.

Les molécules HLA de classe II sont formées d'hétérodimères (Figure 3) comprenant une chaîne alpha ( $\alpha_1$  et  $\alpha_2$ ) et une chaîne bêta ( $\beta_1$  et  $\beta_2$ ), (Brown et al. 1993). Ces molécules ont une distribution tissulaire plus restreinte que les molécules de classe I classiques, elles sont principalement exprimées à la surface des cellules du système immunitaire capables de présenter des peptides antigéniques aux lymphocytes T, c'est-à-dire les lymphocytes B, les monocytes, macrophages et cellules dendritiques. Elles sont également exprimées par des précurseurs de cellules hématopoïétiques, et sur des tissus tels que l'endothélium vasculaire et les glomérules rénaux (Bignon 2000).



**Figure 3: Les molécules HLA de classe I et de classe II**

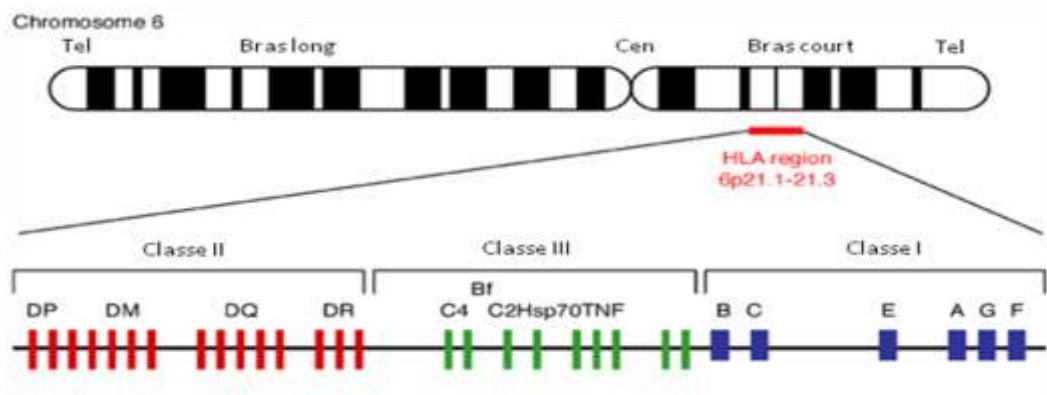
Les molécules HLA de classe I sont constituées d'une chaîne  $\alpha$  formée de trois sous-unités, associée à une  $\beta_2$ -microglobuline. Ce complexe interagit principalement avec les lymphocytes T CD8. Les molécules HLA de classe II sont constituées d'une chaîne  $\alpha$  et d'une chaîne  $\beta$ , chacune formée de deux sous-unités. Les molécules HLA de classe II interagissent avec les lymphocytes T CD4.

Parmi les molécules HLA de classe II, les molécules DR sont les plus représentées à la surface des cellules (Zhao et al. 1993). Ces molécules sont le produit de l'expression d'un gène DRA, peu variant et codant pour la chaîne alpha, et d'un gène DRB1, très polymorphe et codant pour la chaîne bêta. Certains haplotypes ont la particularité de posséder dans certains cas des gènes additionnels, appelés DRB3, DRB4 et DRB5. Ces gènes codent pour des chaînes bêta polymorphes, capables de s'associer à la chaîne alpha.

Les molécules DQ sont issues de l'expression d'un gène DQA1, dont il existe plusieurs allèles codant pour la chaîne alpha, et d'un gène DQB1, peu polymorphe, codant pour la chaîne bêta.

Les molécules HLA DP sont actuellement les moins connues des trois types. Elles proviennent de l'expression des gènes DPA1 et DPB1 codant respectivement pour les chaînes alpha et bêta.

Les peptides antigéniques sont associés aux molécules HLA de classe I ou de classe II au niveau du réticulum endoplasmique et l'ensemble est alors transporté vers la membrane pour être présenté aux lymphocytes circulants.



**Figure 4: Carte physique simplifiée de la région chromosomique HLA (Narinder K. Mehra and Gurvinder Kaur)**

La région HLA s'étend sur  $4 \times 10^6$  nucléotides sur le chromosome 6, depuis le site 6p21.1 au site 6p21.3. Les gènes codant pour les molécules HLA de classe II, de classe III et de classe I sont donc localisés entre le centromère (Cen) et le télomère (Tel) du bras court.

## 2- Les autres molécules du système HLA

Il existe d'autres classes du système HLA que l'on appelle les molécules HLA de classe I non classiques, de classe II non classiques et HLA de classe III.

Le HLA de classe I non classique regroupe des gènes transcrits en faible quantité, les molécules HLA-E, -F, -G et MIC (MHC related chain). Ces molécules, de polymorphisme beaucoup plus limité que pour les classes I et II classiques, sont également associées à une molécule de bêta-2-microglobuline (sauf les molécules MIC) mais possèdent une partie intracytoplasmique raccourcie. De plus, des épissages alternatifs peuvent conduire à un clivage et produire des molécules solubles, comme pour le HLA-G (Moreau et al. 1995). Ces molécules sont potentiellement capables de présenter des peptides antigéniques aux lymphocytes T (Braud et al. 1998).

Les molécules HLA de classe II non classiques comprennent les gènes codant pour HLA-DO et HLA-DM. Ces molécules qui présentent des homologies de séquence avec les molécules HLA de classe II classiques, interviennent indirectement dans la sélection des peptides présentés par les molécules HLA-DR, -DQ et -DP. Ainsi, la molécule HLA-DM clive le peptide CLIP fixés aux molécules HLA de classe II afin de leur permettre de fixer un peptide antigénique à présenter aux cellules du système immunitaire. HLA-DO inhibe l'action d'HLA-DM, affectant de ce fait le répertoire des peptides présentés en surface (van Ham et al. 1997), (Jensen 1998).

Contrairement aux gènes des classes précédentes, les gènes de la classe III ne codent pas pour des molécules impliquées directement ou indirectement dans la présentation des peptides. En effet, la classe III regroupe entre autre des gènes codant pour des molécules intervenant entre autre dans la voie du complément. On y trouve le C2 et le C4 qui sont des composants de la cascade du complément, le facteur B qui est impliqué dans la voie alterne du complément, ainsi que le TNF $\alpha$  (Tumor Necrosis Factor  $\alpha$ ), une molécule jouant un rôle dans les phénomènes d'inflammation (Spies et al. 1986).

## **II- Rôle du système HLA en immunologie**

Toute cellule nucléée porte à sa surface des molécules HLA, soit de classe I, soit de classe II, portant normalement un peptide. En condition normale, les molécules HLA d'un individu présentent les peptides dits « du soi », c'est-à-dire les peptides issus de la dégradation des protéines de cet individu. Les lymphocytes rencontrant ces associations HLA de l'individu/peptide du soi sont éduqués pour ne pas répondre. Dès lors que les peptides n'appartiennent plus au soi, comme c'est le cas lors d'une infection, l'association HLA/peptide entraîne une réponse immunitaire. En cas d'infection virale les peptides endogènes « anormaux » sont portés par les molécules HLA de classe I et entraînent une réponse immunitaire via une reconnaissance par les lymphocytes T cytotoxiques (T-CD8). S'il s'agit d'une infection par un corps exogène, les molécules HLA de classe II présentent les peptides exogènes aux lymphocytes T helpers (T-CD4). Dans le cas d'une transplantation, les cellules du greffon expriment des complexes HLA étranger/peptide étranger qui peuvent déclencher une réaction immunitaire par le biais d'une reconnaissance du HLA étranger par les lymphocytes T du patient, ce qui risque de compromettre la survie du greffon.

## **III- Le système HLA en transplantation**

### **1- Réponse humorale de l'hôte contre son greffon**

Un rejet qui se produit suite à l'apparition d'anticorps DSA détectables dans le sérum du patient est un rejet appelé humorale. En effet, les organes transplantés chez les patients receveurs portent sur leurs cellules des molécules HLA et des peptides appartenant au donneur. Il a très tôt été démontré que lorsque le receveur et le donneur du greffon ne sont pas génétiquement identiques pour les gènes du système HLA, les greffons ont une survie

moins longue (Opelz et al. 1999). En effet, les cellules du tissu rénal portent à leur surface à la fois les molécules HLA de classe I et celle de classe II. Ce qui veut dire que chaque cellule présente deux molécules HLA-A (identiques ou différentes suivant l'état d'homo- ou hétérozygotie de l'individu pour ce gène), deux molécules HLA-B, deux molécules HLA-C, deux molécules HLA-DR, deux molécules HLA-DQ et deux molécules HLA-DP. Ce qui donne donc six complexes HLA/peptide du donneur qui sont introduits chez le receveur lors de la greffe.

C'est pourquoi lorsqu'un patient doit être transplanté, il est nécessaire de lui trouver un greffon exprimant des molécules HLA aussi proches que possible des siennes. Chaque différence constitue ce que l'on appelle une incompatibilité ou un « mismatch » qui peut potentiellement déclencher une réponse de l'hôte contre son greffon (Mohanakumar et al. 1981). Cette réaction engendre un panel plus ou moins important d'anticorps dirigés contre les molécules HLA du donneur, et que l'on appelle des anticorps donneur-spécifiques (ou DSA pour Donor Specific Antibodies). Ces anticorps DSA sont souvent accompagnés d'anticorps anti-HLA dirigés contre des molécules qui ne sont pas portées par le greffon, on parle alors d'anticorps anti-HLA non DSA. La présence d'anticorps anti-HLA, DSA ou non, détectés dans le sérum des patients est corrélée avec une diminution de la survie du greffon (Hourmant et al. 2005).

## **2- Immunisation des patients**

La présence d'anticorps anti-HLA dans le sérum d'un patient est la conséquence d'une réponse immunitaire contre son greffon. Cependant, d'autres facteurs sont également à l'origine du développement d'anticorps. L'échec d'une greffe antérieur est la source principale d'immunisation chez les patients en attente de greffe. Les transfusions sanguines augmentent également l'immunisation induite par une grossesse ou une greffe antérieure. C'est pourquoi un(e) patient(e) ayant déjà été greffé(e), eu une grossesse, reçu une transfusion sanguine ou plusieurs de ces facteurs, présente un panel parfois important d'anticorps anti-HLA dans son sérum. On dit qu'il est immunisé, voire hyperimmunisé lorsque le pourcentage d'anticorps anti-HLA dépasse les 80%. Plus l'état d'immunisation est important, plus le panel de molécules HLA qu'il est possible de transplanter sans risques est restreint et donc plus le nombre de greffons potentiels se réduit. Il est extrêmement difficile de trouver un greffon compatible pour les patients hyper-immunisés (Antoine 2008), c'est pourquoi ces patients bénéficient de priorités dans l'attribution d'un greffon. De plus en plus souvent, ces patients se voient proposer des protocoles dits de désensibilisation avant la

greffe, soit par injection intraveineuse d'immunoglobulines (IVIg), soit par plasmaphérèse, souvent en association avec un anticorps anti-CD20 (rituximab). Ainsi il est impératif d'évaluer le degré de compatibilité entre le donneur et le receveur du greffon avant la greffe, ainsi que de procéder à un suivi régulier de la présence d'anticorps anti-HLA chez le receveur une fois l'organe transplanté.

## **IV- Détection et monitoring des anticorps anti-HLA DSA**

### **1- Tests de compatibilité (Crossmatch)**

Le principe du crossmatch est de mettre en contact les lymphocytes (et leurs molécules HLA) du donneur et le sérum du receveur afin de détecter d'éventuels anticorps DSA chez ce dernier. Si des anticorps anti-HLA sont détectés chez le receveur, le crossmatch est positif ce qui représente un facteur de risque élevé de rejet si la greffe est pratiquée. Deux techniques de crossmatch sont utilisées couramment, une troisième a été développée plus récemment (Howell et al. 2010) :

- Le Crossmatch LCT (Lymphocytotoxicité) ou CDC (Complement Dependent Cytotoxicity)

Cette technique consiste à incuber le sérum du patient avec d'une part les lymphocytes T et d'autre part les lymphocytes B du donneur, en présence de complément. Si le sérum du patient contient des anticorps dirigés contre le donneur, les lymphocytes sont détruits par le complexe anticorps/complément. Les sérum peuvent être traités au dithiothréitol (DTT) avant le crossmatch afin de différencier une réaction positive due aux IgM (Immunoglobulines M), qui sont généralement des autoanticorps non délétères pour le transplant, d'une réaction induite par les IgG (Immunoglobuline G). Un crossmatch T positif implique une réponse anti-HLA de classe I et constitue la plupart du temps une contre indication à la greffe. Un crossmatch B positif, s'il est la conséquence d'anticorps anti-HLA de classe II, est également de mauvais pronostic pour le devenir du greffon (Le Bas-Bernardet et al. 2003), (Eng et al. 2008).

- Le crossmatch en cytométrie de flux

Le but est là encore d'incuber le sérum du receveur avec les lymphocytes du donneur. Après lavage, un anticorps anti-IgG humaine couplé à un fluorochrome est ajouté pour permettre une détection par cytométrie de flux du complexe anticorps-lymphocyte. Cette technique est plus sensible que celle basée sur la LCT car elle permet de détecter à

la fois les anticorps activant le complément et ceux qui ne l'activent pas. Ainsi, tout anticorps qui se fixe sur les lymphocytes sera détecté, quel que soit son effet sur la cellule. Cette technique offre l'avantage de ne pas détecter les IgM, cependant la standardisation pose problème.

- Le crossmatch en phase solide (technologie Luminex ou ELISA)

Cette technique est la plus récente des trois. La différence majeure qu'elle apporte est l'utilisation de microsphères coatées avec des molécules HLA, et non plus directement l'utilisation des lymphocytes du donneur, qui sont parfois disponibles en faible quantité. Ainsi, des billes de polystyrène portant à leur surface des molécules HLA identifiées sont disponibles individuellement ou en pool dans le commerce. Le typage HLA du donneur étant connu, les billes portant les antigènes HLA correspondants sont incubées avec le sérum du receveur, puis révélées avec un anticorps anti-IgG humaine couplé à un fluorochrome.

Schönemann a comparé l'efficacité de la technique d'Enzyme Linked Immunosorbant Essay (ELISA) par rapport à celle plus ancienne de CDC (Schönemann et al. 1998). Cette étude a démontré que la technique ELISA est aussi performante que le CDC à quelques différences près. Contrairement à l'ELISA, la technique CDC permet de détecter des anticorps de type IgM, de même que des anticorps dirigés contre des antigènes autres que HLA. La technique ELISA quand à elle détecte les anticorps anti-HLA de type IgG de manière plus sensible que le CDC, elle permet également de détecter des anticorps n'activant pas le complément, et de différencier facilement les cibles HLA classe I de celles de classe II.

Il existe également un kit de cross-match, XM-ONE® permettant la détection d'anticorps dirigés contre les cellules endothéliales.

## **2- Détection et suivi des anticorps anti-HLA chez les patients transplantés**

La présence d'anticorps anti-HLA est surveillée régulièrement, en moyenne une fois par an chez les patients, plus souvent si une dégradation de la fonction du greffon est constatée. Pour cela, différentes techniques sont appliquées, allant de la simple détection d'anticorps anti-HLA jusqu'à l'identification allélique de la molécule ciblée, selon trois étapes :

- La détection

Cette étape consiste à faire un premier screening et à rechercher dans le sérum du patient la présence d'anticorps anti-HLA. Le sérum à tester est incubé sur un panel d'antigènes HLA solubles ou coatés sur des billes, classes I et II confondues.

- L'identification

Les antigènes HLA de classe I et de classe II sont analysés séparément au cours de cette étape. Le sérum à tester est incubé avec des billes portant chacune le produit d'une cellule, à savoir deux molécules HLA-A, deux HLA-B et deux HLA-C pour la classe I ou deux HLA-DQ, deux HLA-DR et deux HLA-DP pour la classe II.

- La haute définition

Cette dernière étape, la plus couteuse et la plus précise, permet d'identifier au niveau allélique les molécules HLA ciblées par les anticorps anti-HLA. Le sérum à tester est cette fois incubé avec des billes portant un seul variant allélique d'un seul antigène HLA.

Un test ELISA peut être utilisé pour les étapes de détection et d'identification. Dans ce cas des molécules HLA solubles sont coatées dans les puits, incubées avec le sérum et le complexe est révélé par l'ajout d'un anticorps secondaire couplé à une enzyme, puis d'un substrat. La mesure se fait ensuite par dosage colorimétrique. Une autre alternative plus répandue aujourd'hui est la technique Luminex®, où les billes sont incubées dans des bains de fluorochromes dilués de 10 en 10, et la fluorescence émise permet de les identifier individuellement. L'acquisition se fait sur un lecteur possédant deux lasers. Le premier identifie la bille, le second détecte la fixation d'un anticorps dirigé contre le ou les antigène(s) qu'elle porte.

## V- Rôle délétère des anticorps anti-HLA en transplantation

Comme cité précédemment, la présence d'anticorps anti-HLA dans le sérum d'un patient transplanté est un facteur de risque pour le devenir du greffon. L'implication des anticorps développés *de novo* après une transplantation, et dirigés contre le HLA de classe I est connue, ces anticorps sont majoritairement associés à des épisodes de rejet aigu (Worthington et al. 2003). La présence d'anticorps dirigés contre les molécules HLA de classe

Il est plutôt associée aux rejets chroniques. Une étude réalisée par Campos (Campos et al. 2006) a mis en évidence un rôle majeur des anticorps anti-HLA de classe II dans l'apparition d'une dysfonction rénale et la survenue de Néphropathie Chronique d'Allogreffe (CAN). Une observation similaire a été faite par Issa et al (Issa et al. 2008), plus le patient présente d'anticorps anti-HLA de classe II, plus on observe de dépôts de C4d sur son greffon, plus le risque pour le patient de développer une Glomérulopathie du Transplant (GT) augmente. Cependant tous les anticorps anti-HLA développés en post-greffe ne sont pas obligatoirement dirigés contre les antigènes du greffon, mais sont très souvent associés à des DSA. Plusieurs équipes ont démontré que la plupart des anticorps anti-HLA non DSA reconnaissent des épitopes qui sont aussi présents sur des molécules HLA ou autre du greffon (Mao et al. 2007). Ce sont donc des homologies de séquence et de structure des antigènes qui entraîneraient le développement de ces anticorps non donneur-spécifiques. Duquesnoy (Duquesnoy 2008) confirme ces résultats et émet l'hypothèse que la chaîne alpha des molécules HLA de classe II DQ serait aussi immunogène que la chaîne bêta car elle aussi présenterait des épitopes aux lymphocytes du receveur. Reprenant cette notion d'épitopes, Barocci (Barocci et al. 2007) a démontré que le sérum de patients en attente d'une seconde ou d'une troisième greffe contient une grande quantité d'anticorps anti-HLA de classe I (80.6% des patients) très souvent associés à des anticorps anti-HLA de classe II (54.2% des patients). Ces patients sont en grande partie immunisés contre les antigènes de leur premier greffon, mais certains d'entre eux présentent également des anticorps non DSA, induits par la présence d'épitopes plus communs. La persistance dans leur sérum d'anticorps anti-HLA complique donc la recherche d'un nouveau greffon pour ces patients. Süssal (Süssal et al. 2004) s'est intéressée à l'influence de la pré-immunisation chez les patients transplantés rénaux et elle a démontré qu'une pré-immunisation contre des antigènes HLA de classe II n'entraîne pas une baisse de survie du greffon par rapport à un patient non immunisé. La pré-immunisation contre des antigènes de classe I augmente le risque de rejet, phénomène qui est d'autant plus important si la pré-immunisation concerne à la fois les antigènes HLA de classe I et de classe II.

## **VI- Isotypes des anticorps anti-HLA**

### **1- Classes d'immunoglobulines en transplantation**

Suite à une transplantation, les premières immunoglobulines à être produites contre le greffon sont des immunoglobulines de type M (IgM). Ces anticorps pentamériques sont tout à fait capables de se lier aux antigènes étrangers ainsi que de fixer le complément. Ces IgM sont des autoanticorps, et sont rarement dirigées contre les molécules HLA.

La seconde vague d'immunoglobulines produites contre l'organe greffé sont les immunoglobulines de type G (IgG). Ce sont ces IgG qui sont surveillées en cross-match avant la greffe et dans le suivi régulier des patients transplantés. Ces IgG sont divisées en quatre sous-classes ou isotypes.

## 2- Isotypes d'IgG

Comme toutes les immunoglobulines, ces homodimères sont constitués d'une partie constante et d'une partie variable. La fraction variable est extrêmement polymorphe grâce au système de recombinaison des gènes VDJ, de façon à couvrir l'ensemble des antigènes existants. La partie constante est une région très conservée, ne variant que de quelques résidus d'une IgG à l'autre, donnant ainsi quatre sous-classes ou isotypes d'IgG, nommées IgG1, IgG2, IgG3 et IgG4.

Bien que les quatre isotypes d'IgG aient des séquences et structures extrêmement proches, les quelques nucléotides qui les différencient leur confèrent des fonctions et caractéristiques distinctes. L'IgG4 se démarque notamment des trois autres car elle a la particularité de posséder une région charnière instable et de ce fait, cette immunoglobuline peut échanger ses chaînes et fonctionner soit en structure monovalente, soit en structure bivalente (Aalberse et al. 2002). L'IgG3 possède une région charnière plus longue que les trois autres isotypes, ce qui la rend plus sensible à la protéolyse, elle a une demi-vie plus courte. Le dimère IgG2 peut s'assembler en tétramère selon l'antigène ciblé (Salfeld 2007).

	IgG1	IgG2	IgG3	IgG4
<b>Forme fonctionnelle <i>in vivo</i></b>	Monomérique bivalent	Dimérique tétravalent	Monomérique bivalent	Demi-Ig monovalent
<b>Rôle biologique dans la réponse immunitaire</b>	Reconnaissance des antigènes protéiques	Reconnaissance des antigènes carbohydrate	Reconnaissance des antigènes protéiques	Réponse aux stimulations chroniques
<b>Pourcentage des IgG humaines</b>	60 %	25 %	10 %	5 %

Demi-vie (en jours)	36.3±9.2 (17.6-56.2)	37.1±13.9 (22.9-62.5)	28.6±10.4 (13.0-50.2)	15.6±4.5 (7.1-24.7)
allotypes	4	1	13	0
FcRn	+	+	+	+
Longueur de la région charnière (acides aminés)	15	12	62	12
ponts disulfides reliant les chaînes lourdes	2	4	11	2
<b>Fonctions effectrices</b>				
Cl	++	-	+++	-
FcgRI	+++	-	+++	++
FcgRII	+	±	+	?
FcgRIII	+	-	+	±

**Tableau 1: Principales caractéristiques des 4 isotypes d'IgG (Salfeld 2007)**

Les immunoglobulines G sont divisées en quatre sous-types, IgG1, IgG2, IgG3 et IgG4 possédant des caractéristiques différentes. Les IgG1 sont les plus représentées dans le sérum humain et ont également la demi-vie la plus longue. Elles sont suivies par les IgG2, IgG3 et IgG4. Ces anticorps fonctionnent principalement en structure bivalente ou tétravalente. L'affinité de fixation aux différents FcγR est variable suivant la sous-classe de l'IgG.

Les 4 isotypes d'immunoglobulines G ne sont pas présents en quantités équivalentes dans la circulation sanguine. L'IgG1 est l'isotype le plus important (Tableau 1), représentant environ 60% des IgG totales, suivi par l'IgG2 et l'IgG3 (25 et 10%) et finalement l'IgG4, le plus rare (5%). Cependant ces abondances relatives ne corrèlent pas avec la capacité des isotypes d'IgG à fixer et activer le complément. En effet, l'IgG3 est le meilleur fixateur/activateur du complément, puis l'IgG1, l'IgG2 qui l'active très peu et finalement l'IgG4 est considéré comme n'activant pas le complément (Baldwin et al. 1995). Il est donc admis que l'IgG1 et l'IgG3 activent le complément tandis que l'IgG2 et l'IgG4 ne l'activent pas.

Cette capacité à activer le complément est une notion importante en transplantation d'organe. En effet, l'activation de la cascade du complément conduit à la destruction de la cellule ou du tissu ciblé, et des dépôts de fragments issus de l'activation de la cascade du complément sont parfois retrouvés sur les biopsies de greffons (Feucht 2003). Ces marqueurs indiquent alors qu'une réponse humorale s'est mise en place vis-à-vis de l'organe greffé, ce qui compromet sa survie. La présence d'anticorps donneur spécifiques circulants

est bien établie et reconnue comme facteur de risque pour la survie du greffon. Cependant le rôle des anticorps non activateurs est encore très discuté.

Plusieurs études ont ainsi confirmé que la présence d'isotypes d'IgG activant le complément, à savoir IgG1 et IgG3, chez un patient transplanté corrèle avec les dépôts de C4d, d'autant plus si ces isotypes sont produits simultanément (Bartel et al. 2007). Bartel et al (Bartel et al. 2008) ont mis en évidence la présence simultanée de deux isotypes anti-HLA de classe II chez 38% des patients en attente de greffe, un seul isotype chez 36% des patients, trois isotypes chez 18% et finalement 4 isotypes chez seulement 2% des patients. Ces données démontrent qu'il est fréquent qu'un patient développe plus d'un isotype d'anticorps anti-HLA à la fois. La question qui se pose alors est de savoir si le ratio d'anticorps activateurs vs non activateurs peut expliquer ou prédire la survie d'un organe greffé. Une étude menée par Griffiths (Griffiths et al. 2004) a démontré que la présence en pré-greffe d'IgG1 seul chez des patients immunisés corrèle avec une diminution de la survie du greffon alors que s'il est accompagné des autres isotypes, il n'y a plus de corrélation. En revanche Gao (Gao et al. 2004) suspecte l'IgG3 produite *de novo* d'être responsable aussi bien des rejets aigus cellulaires, par un mécanisme inconnu, que des rejets chroniques. Il observe également chez ses patients transplantés d'un foie que l'IgG4 augmente régulièrement au cours du temps, en conséquence d'une stimulation chronique par l'antigène étranger. L'étude menée par Arnold et al (Arnold et al. 2008) met en évidence une distribution différente des isotypes d'IgG suivant la classe de molécules HLA ciblées. Ainsi chez 40% des patients en attente d'une nouvelle greffe, des IgG2 et IgG4 DSA sont détectées. Les IgG2 ciblant à la fois les molécules HLA de classe I et de classe II tandis que les IgG4 sont majoritairement anti-HLA classe II. En opposition à ces résultats, il a été montré que les IgG DSA qu'elles soient activatrices du complément ou non, présentes avant la greffe, corrèlent avec un risque élevé de rejet (Rose et al. 2009). Enfin, l'étude des isotypes anti-HLA élués du greffon révèle que la survie du greffon n'est pas augmentée en présence d'IgG2 et IgG4, en revanche elle est améliorée si les anticorps se trouvent dans le greffon et non pas dans la circulation sanguine (Heinemann et al. 2007).

# L'auto-immunité

Le développement des anticorps anti-HLA donneur-spécifiques consécutivement à la transplantation joue un rôle non négligeable sur le devenir du greffon, cependant la réponse humorale ne se limite pas à ces anticorps. En effet, une littérature croissante évoque la présence d'anticorps anti-HLA non donneur-spécifiques, avant la greffe ou développés *de novo*, ainsi que d'anticorps dirigés contre des molécules non HLA. Toutefois, ces protéines sont souvent du soi, et le système immunitaire maintient normalement une tolérance B visant à empêcher le développement d'auto-anticorps. Le développement *de novo* d'auto-anticorps implique alors une rupture de la tolérance B suite à la transplantation, et l'impact de ce phénomène sur le devenir du greffon constitue une nouvelle source potentielle d'aggression du greffon.

## I- La tolérance B

La tolérance est caractérisée par l'absence de réponse immunitaire à un antigène. Le répertoire des lymphocytes B est extrêmement vaste, de ce fait les cellules B portent à leur surface des récepteurs antigéniques pouvant être dirigés contre des molécules du soi ou du non soi. Le développement de ces cellules a lieu dans la moelle osseuse où sont exprimées des molécules du soi, et où se produit la tolérance centrale. Si le récepteur antigénique d'un lymphocyte B immature se lie avec une affinité élevée à une molécule du soi, le clone auto-réactif est éliminé par apoptose lors de la délétion clonale (Nemazee et Bürki 1989), ou bien par révision du récepteur afin d'éliminer l'auto-réactivité (Nemazee 1999). La délétion clonale est cependant limitée car certaines molécules du soi ne sont exprimées que dans certains organes, et les lymphocytes B portant des récepteurs capables de reconnaître ces antigènes échappent donc à la sélection clonale. Plusieurs mécanismes de secours périphériques interviennent alors afin de maintenir la tolérance des clones auto-réactifs et de les empêcher de déclencher une pathologie auto-immune.

### 1- L'élimination dans les tissus lymphoïdes périphériques

Les lymphocytes B auto-réactifs peuvent également être éliminés dans les tissus périphériques (Russell et al. 1991). Ainsi, dans les tissus lymphoïdes périphériques, les lymphocytes B entrent dans la zone T. Là, les lymphocytes B reconnaissant les antigènes étrangers interagissent avec des lymphocytes T auxiliaires folliculaires correspondants, migrent dans la zone B et peuvent évoluer en plasmocytes ou lymphocytes B mémoires. En revanche, les lymphocytes B reconnaissant des molécules du soi ne rencontrent normalement pas de lymphocyte T correspondant (donc également auto-réactif) et entrent en apoptose (Cyster et al. 1994).

## **2- L'anergie**

L'état d'anergie des lymphocytes B auto-réactifs peut se déclencher lorsque le lymphocyte rencontre son antigène soluble. Cette interaction entraîne une diminution de l'expression des IgM de surface, ainsi qu'une réduction de la transmission des signaux intracellulaires induits, empêchant ainsi l'activation des cellules B et leur différenciation en plasmocytes (Goodnow et al. 1988). L'anergie est un phénomène antigène-spécifique et aboutit généralement à l'apoptose des lymphocytes B auto-réactifs.

## **3- Elimination dépendante des lymphocytes T par la voie de Fas/FasL**

Il arrive quelques fois que des lymphocytes T auto-réactifs parviennent à maturité et soient activés. Dans le cas (rare) où un lymphocyte T auto-réactif activé rencontre le lymphocyte B portant l'auto-antigène correspondant, l'interaction du récepteur Fas du lymphocyte B avec le ligand FasL du lymphocyte T induit un signal d'apoptose chez le clone B. Le lymphocyte B auto-réactif est alors éliminé.

## **4- Elimination dans les centres germinatifs**

La recombinaison VDJ au moment du développement des lymphocytes B dans la moelle osseuse détermine la spécificité du récepteur ainsi que son affinité pour l'antigène. Les lymphocytes B activés peuvent subir une hypermutation somatique dans les centres germinatifs, c'est-à-dire des mutations dans la séquence de l'immunoglobuline produite, via intervention des RAG1 et 2 (Recombinant activating gene), afin d'augmenter son affinité pour son antigène. Au cours de cette étape, des lymphocytes B reconnaissant des antigènes étrangers peuvent engendrer des lymphocytes auto-réactifs (Han et al. 1996), (Kawai et al. 2008). Cependant, la rencontre de ces clones avec une dose importante d'antigènes solubles

déclenche en quelques heures une vague d'apoptose visant à éliminer ces lymphocytes B auto-réactifs.

La présence dans l'organisme de lymphocytes B auto-réactifs est donc naturelle et ne représente pas de danger tant que les mécanismes de tolérance sont en place. En effet, les lymphocytes B doivent rencontrer leur antigène et recevoir des signaux additionnels, notamment des lymphocytes T, avant de pouvoir déclencher une réponse immunitaire.

## **II- Rupture de tolérance et auto-immunité**

Comme il a été décrit précédemment, plusieurs mécanismes de tolérance empêchent les lymphocytes B auto-réactifs d'induire une réponse immunitaire adaptative. Il existe cependant des voies d'activation, de prolifération et de différenciation des lymphocytes B indépendantes des lymphocytes T, qui pourraient alors activer des lymphocytes B auto-réactifs. En effet, les lymphocytes B portent à leur surface des récepteurs TLR (Toll Like Receptor) capables d'induire une réponse immunitaire innée (Kawai et al. 2008) après reconnaissance de motifs conservés sur les molécules microbiennes, tels que des lipopeptides, lipopolysaccharides, ARN simple ou double brin et ADN contenant des motifs CpG (Uematsu et al. 2008).

Il a ainsi été montré que suite à une infection virale ou stimulation du TLR, les cellules dendritiques plasmacytoides秘ètent de grandes quantités d'interféron de type I, qui augmente l'expression du TLR7 chez les lymphocytes B naïfs (Bekeredjian-Ding et al. 2005). De plus, la stimulation du TLR7 par son ligand Resiquimod induit *in vitro* la sécrétion d'IgG et IgM de façon T-indépendante dans un environnement IL-2 et IL-10 (Glaum et al. 2009) . Des lymphocytes B auto-réactifs IgG<sup>+</sup> ont d'ailleurs été observés dans le pool de lymphocytes mémoires chez des individus sains (Tiller et al. 2007).

Une infection virale ou bactérienne serait alors potentiellement capable d'induire une rupture de la tolérance périphérique et d'activer des lymphocytes B auto-réactifs, générant ainsi des auto-anticorps pouvant conduire à une pathologie auto-immune.

D'autre part, la production de novo d'auto-anticorps a également été observée suite à des transplantations d'organes chez des patients sans antécédent de maladie auto-immune. Les

mécanismes conduisant à la production de ces auto-anticorps ne sont pas encore parfaitement définis mais plusieurs hypothèses sont formulées. Lors de la transplantation, l'ischémie/reperfusion induit des lésions des tissus conduisant à de l'inflammation, de l'apoptose des cellules du greffon et à la production d'espèces réactives à l'oxygène (ROS). Il a été montré que les protéines peuvent être endommagées par les ROS et les protéases de l'apoptose, et que les néo-anticorps ainsi formés sont reconnus par des auto-anticorps circulants (Sheikh et al. 2007). Ces modifications des protéines du soi après transplantation pourraient donc contribuer à la production d'auto-anticorps. Le polymorphisme des protéines du greffon est susceptible de provoquer une réaction similaire chez l'hôte (Afzali et al. 2007), de même que l'exposition de néo-anticorps induite par un environnement inflammatoire (Walter G Land 2005). Enfin, le rôle de l'autophagie a également été évoqué. Ce phénomène contribue à la dégradation et au recyclage des protéines cellulaires et il a été montré que l'autophagie contribue à l'auto-immunité en promouvant la présentation d'anticorps cytosoliques par les molécules HLA de classe II (Dengjel et al. 2005). Toutefois il est difficile de savoir de quelle manière ces auto-anticorps influencent la survie du greffon. Leur présence n'implique pas nécessairement de lésion directe du greffon, ils peuvent être de simples indicateurs d'une réponse allo-immune importante. Certains auto-anticorps sont pourtant spécifiques d'un organe, ce qui pourrait s'expliquer par l'expression de l'antigène à la surface des cellules du greffon. En effet, les protéines intracellulaires normalement inaccessibles aux anticorps peuvent être transloquées sous forme de bourgeonnements à la surface des cellules en cours d'apoptose, et devenir alors accessibles aux cellules immunitaires (Casola-Rosen et al. 1994).

Ces diverses observations suggèrent que la rupture de tolérance B et l'auto-immunité commencent par une infection, ou une transplantation engendrant des lésions des cellules du greffon. Les lésions ont pour conséquence la modification des protéines, qui sont alors accessibles aux lymphocytes B et T auto-réactifs. La reconnaissance de ces auto-anticorps par les cellules immunitaires peut potentiellement influencer le devenir du transplant.

# **Le rejet chronique**

## **I- Evolution de la définition du rejet chronique : la classification de Banff**

Malgré les progrès réalisés dans le domaine de la chirurgie, des techniques de prélèvement d'organes et des traitements immunsupresseurs, la survie des greffons à long terme reste un problème majeur en transplantation. Près de 50% des greffons sont perdus à dix ans post-greffe, suite à des lésions chroniques du transplant. Ces lésions peuvent avoir de nombreuses causes, immunologiques ou non, qu'il est important de comprendre et d'identifier afin de mettre en place de façon précoce un traitement adapté. Dans cette optique, un système de classification des lésions du transplant a été développé.

### **1- 1<sup>ère</sup> conférence de Banff : mise en place de la classification**

En 1991, un groupe de néphrologues, pathologistes et chirurgiens s'est réuni dans la ville de Banff afin d'élaborer un système de classification et de nomenclature internationale standardisé du rejet rénal d'allogreffe (Solez et al. 1993). Cette action avait pour but d'aider au diagnostic du rejet de greffe, de fournir des pistes afin d'adapter au mieux les traitements immunsupresseurs et d'uniformiser les données mondiales.

Cette réunion a permis de définir un certain nombre de catégories de statut du greffon, qui étaient: (1) normal, (2) rejet hyperaigu, (3) changements «borderline» ou limite, (4) rejet aigu, (5) rejet chronique ou Néphropathie Chronique d'Allogreffe (CAN) et (6) autre. Les catégories 4 et 5 étaient encore subdivisées en grades suivant la sévérité ou l'étendue des dommages rénaux, avec (I) léger, (II) modéré et (III) sévère. Un système de score, associé à la classification ou à utiliser seul a également été mis en place. Un degré (1=léger, 2=modéré et 3=sévère) a été attribué aux différentes lésions (Tableau 2)

<b>Changements aigus</b>	
<b>g</b>	Glomérulite
<b>i</b>	Infiltration interstitielle de cellules mononucléées
<b>t</b>	Tubulite
<b>v</b>	Artérite intimal
<b>ah</b>	Nodule hyalin épaisissant l'artère afférente
<b>Changements chroniques</b>	
<b>cg</b>	Glomérulopathie chronique du transplant
<b>ci</b>	Fibrose interstitielle
<b>ct</b>	Atrophie Tubulaire
<b>cv</b>	Epaississement intimal Fibreux

**Tableau 2: nomenclature des facteurs aigus et chroniques**

Les principaux facteurs histologiques permettant de définir des changements aigus ou chroniques se produisant dans le greffon ont été regroupés dans ce tableau. Les symboles g, i, t et ah décrivent des changements aigus tandis que les symboles cg, ci et cv décrivent des changements chroniques.

De cette manière, l'observation des coupes histologiques issues des biopsies de greffon permettait de déterminer si le rein était normal, en rejet hyperaigu, aigu, chronique ou en déclin suite à une atteinte indéterminée. Les critères d'observation et de classification étant homogènes entre les laboratoires, les études multicentriques ont été simplifiées. La première classification de Banff était mise au point et n'a cessé d'être approfondie et précisée depuis.

## **2- 4ème conférence de Banff: Définitions histologiques**

Suite à la première conférence de 1991, les experts ont continué à se réunir tous les deux ans afin de mettre à jour et de standardiser les systèmes de nomenclature et de classification élaborés en 1991. En 1997, le comité d'expert a réactualisé la classification de Banff (Racusen et al. 1999) en y ajoutant des éléments du Collaborative Clinical Trials in Transplantation (CCTT), de différents congrès internationaux et de la littérature.

Une grande nouveauté a été l'apparition de nouvelles notions, dont le rejet à médiation humorale (AMR pour antibody-mediated rejection), soit immédiat (type A), soit tardif (type B), qui remplaçait le terme de rejet hyperaigu. Le rejet aigu, aussi dénommé rejet actif a été développé, les grades n'étant plus simplement I, II ou III, mais portant des caractéristiques histopathologiques : IA ou IB suivant que l'infiltrat interstitiel soit accompagné d'une tubulite

sévere ou modérée, IIA ou IIB selon la gravité de l'artérite et enfin III pour les caractéristiques les plus sévères. La catégorie du rejet chronique s'est vue attribuer le qualificatif de sclérosant et les grades ont été redéfinis histologiquement en fonction de l'étendue de la fibrose interstitielle et de l'atrophie tubulaire.

Comme pour le rejet aigu, les scores des lésions ont été précisés et approfondis. Par exemple, concernant la glomérulopathie du transplant (GT), la notion de « doubles contours » a été introduite et utilisée pour déterminer la sévérité de l'atteinte (Tableau 3).

<b>cg0</b>	Pas de glomérulopathie, doubles contours affectant moins de 10% des boucles capillaires périphériques dans les glomérules les plus affectés
<b>cg1</b>	Doubles contours affectant jusqu'à 25% des boucles capillaires périphériques dans les plus affectés des glomérules non sclérotiques
<b>cg2</b>	Doubles contours affectant 26 à 50% des boucles capillaires périphériques dans les plus affectés des glomérules non sclérotiques
<b>cg3</b>	Doubles contours affectant plus de 50% des boucles capillaires périphériques dans les plus affectés des glomérules non sclérotiques

**Tableau 3 : critères quantitatifs de la Glomérulopathie du Transplant ("cg")**

Des scores ont été attribués à chaque lésion de changement chronique ou aigu. La glomérulopathie du transplant est subdivisée en 4 grades notés cg0 à cg3 selon l'étendue de la lésion.

De plus, une attention particulière a été portée sur la qualité des prélèvements servant aux observations histologiques. L'observation devait porter au moins sur sept glomérules et une artère. Sept lames étaient conseillées, dont trois pour une coloration à l'hématoxyline et à l'éosine, trois à l'acide périodique de Schiff ou à l'argent et une au trichrome.

Des données supplémentaires ont été ajoutées par la suite à la classification de Banff (Racusen et al. 2003). Les critères caractérisant le rejet humorale ont été définis ainsi :

- (1) Evidences morphologiques d'atteinte aigue

- (2) Evidences immunologiques d'une atteinte humorale : C4d et/ou Immunoglobulines dans les capillaires péri-tubulaires
- (3) Présence d'anticorps circulants anti-HLA donneur-spécifiques ou dirigés contre des antigènes endothéliaux.

### **3- 8ème conférence de Banff: Fibrose Interstitielle et Atrophie Tubulaire**

Au cours de la huitième conférence de Banff en 2005, les discussions ont principalement porté sur la catégorie n°5, la CAN sclérosante (Solez et al. 2007). En effet, depuis son entrée dans la classification de Banff, le terme de CAN a très largement été utilisé dans la littérature pour désigner une pathologie bien définie. Or ce terme avait été choisi à l'origine afin de regrouper des lésions chroniques dont l'étiologie n'était pas déterminée, et ce pour éviter d'utiliser le terme de rejet chronique car ce dernier suggérait que toutes les atteintes chroniques étaient dues à une réponse alloimmune. La Néphropathie Chronique d'Allogreffe a alors été remplacée par la Fibrose Interstitielle et Atrophie Tubulaire (FIAT), dont les causes potentielles, non immunes, ont été listées. Concernant l'alloimmunité, la participation des anticorps anti-HLA aux phénomènes de rejets chroniques est devenue une évidence et des dépôts de C4d étaient souvent observés simultanément sur les biopsies.

Des précisions ont également été apportées aux catégories des AMR (n°2) et des rejets à médiation cellulaire, anciennement rejet aigu/actif (n°4). Au sein de ces deux catégories, une distinction a été faite entre les rejets aigus et chroniques actifs, chacun ayant son propre système de graduation. La margination des cellules inflammatoires dans les capillaires péri-tubulaires (PTC) a été ajoutée aux lésions de l'AMR chronique avec les scores suivants basés sur les PTC les plus sévèrement touchés (Tableau 4).

<b>ptc0</b>	pas de changement significatif d'inflammation péri-tubulaire corticale
<b>ptc1</b>	capillaire péri-tubulaire cortical avec 3-4 cellules inflammatoires luminales
<b>ptc2</b>	capillaire péri-tubulaire cortical avec 5-10 cellules inflammatoires luminales
<b>ptc3</b>	capillaire péri-tubulaire cortical avec plus de 10 cellules inflammatoires luminales

**Tableau 4: proposition de critère quantitatif pour le score de la margination des cellules inflammatoires dans les capillaires péri-tubulaires.** Les lésions de capillarite péri-tubulaire sont

subdivisées en 4 grades notés ptc0 à ptc3 selon le nombre de cellules inflammatoires luminales observées

Enfin, deux points ne figurant pas directement dans la classification ont été abordés. Des infiltrats de Lymphocytes B étaient souvent observés sur les biopsies par des techniques d'immunomarquage. Le comité d'expert s'est interrogé sur la possibilité de tenter un traitement par rituximab (anti-lymphocyte B) chez des patients présentant un épisode de rejet aigu résistant aux immunosuppresseurs classiques et ayant un infiltrat important de lymphocytes B. D'autre part, la recherche de marqueurs génomiques en transplantation a été proposée comme axe de travail. Ces biomarqueurs permettraient en effet de définir les mécanismes des lésions, d'identifier des cibles pour le développement de nouvelles molécules thérapeutiques et de mettre au point de nouvelles techniques de diagnostic et de monitoring des patients.

#### **4- 9<sup>ème</sup> conférence de Banff : Précisions sur le C4d**

Lors de la 9<sup>ème</sup> conférence de Banff, la présence des dépôts de C4d qui était jusqu'alors corrélée à la présence d'anticorps anti-HLA circulants et constituait un élément nécessaire à la définition de l'AMR, a été dotée d'un score (Solez et al. 2008). Ce score a été défini en fonction du pourcentage de tissu marqué par immunofluorescence (IF) ou Immunohistochimie (IHC). Les dépôts de C4d sans évidence de rejet aigu ou chronique sont de signification indéterminée.

Les critères d'évaluation des lésions de ptc (capillarite péri tubulaire) ont été redéfinis pour ne plus prendre en compte uniquement les PTC les plus touchés, mais un pourcentage de PTC. Dans la nouvelle classification, le score ptc0 a été défini comme impliquant moins de 10% des PTC. Au dessus de ce pourcentage, les scores ptc1, 2 et 3 n'ont pas changé.

Les critères de capillarite péri tubulaire et C4d ont été améliorés en réponse à des travaux qui ont mis en évidence l'importance de l'étude précoce et du suivi de ces facteurs. En effet, une étude prospective a montré qu'une capillarite péri tubulaire à 3 mois post-greffe était prédictive d'une multilamination des membranes basales des PTC et d'une AMR infra-clinique à un an (Lerut et al. 2007). Dans la classification de Banff précédente, la présence de C4d diffus constituait une des lésions nécessaires au diagnostic de l'AMR. Or il a été montré que du C4d focal était également associé à des lésions de glomérulite. De plus, des dépôts de C4d ont été observés à un an post-greffe sur les PTC et dans les glomérules de

26% et 32% de biopsies systématiques. D'autres biopsies ont permis de démontrer que l'inflammation interstitielle, qui était considérée comme non-spécifique dans la classification de 2005, était en réalité corrélée avec une dégradation de la fonction rénale à long terme. Ces travaux ont conduit à la mise en place d'un système de score de l'inflammation totale de l'allogreffe (ti) pour éventuellement être intégré à la classification de Banff par la suite. Enfin, l'attribution de score à l'épaississement hyalin (ah) s'est révélé très peu reproductible, l'ah a donc été remplacé par l'épaississement hyalin artériolaire (aah).

#### **5- 10<sup>ème</sup> conférence de Banff : Rejet à médiation humorale**

La dernière conférence en date s'est déroulée à Banff en 2009, avec pour thème principal les lésions du greffon médiées par les anticorps (Sis et al. 2010).

Le monitoring des anticorps anti-HLA en phase solide est maintenant réalisé en routine. Cette technique est plus sensible et plus spécifique que les techniques utilisées jusqu'alors, par exemple l'ELISA. Cependant cette sensibilité extrême complique la reproductivité des résultats entre les différents laboratoires qui l'utilisent. Bien que la définition de l'AMR implique des anticorps anti-HLA, de plus en plus, l'intérêt des chercheurs se porte sur des anticorps qui ne ciblent pas les molécules HLA, comme des anticorps dirigés contre les cellules endothéliales, le complexe mineur d'histocompatibilité, notamment la MHC class I polypeptide-related sequence A (MICA), ou encore les auto-anticorps. En effet, des épisodes de rejet ont été constatés chez des patients correctement matchés sur le plan HLA. D'autres facteurs entrent alors en jeu, les participants à la dernière conférence ont évoqué les Fc gamma Récépteurs qui fixent les portions Fc des Immunoglobulines (Ig) ainsi que des modifications post-traductionnelles telles que la sialylation des IgG. Plusieurs groupes de travail ont été instaurés afin d'étudier plus spécifiquement 6 thèmes particuliers dans l'optique de les inclure à la classification de Banff.

Depuis 19 ans, la classification de Banff sert de référence aux chercheurs et cliniciens dans le domaine de la transplantation rénale. Les discussions issues des réunions successives et les données de la littérature ont contribué au développement de la classification, qui s'est précisée au fil des années et s'est enrichie de critères histologiques et sanguins pour chaque type de lésion et de rejet (annexe 1). Le rejet chronique, qui était une notion vaste et peu spécifique en 1991 est aujourd'hui devenu une pathologie définie, soit de type cellulaire (TCMR chronique actif), soit de type humorale (AMR chronique), soit dû à des causes non

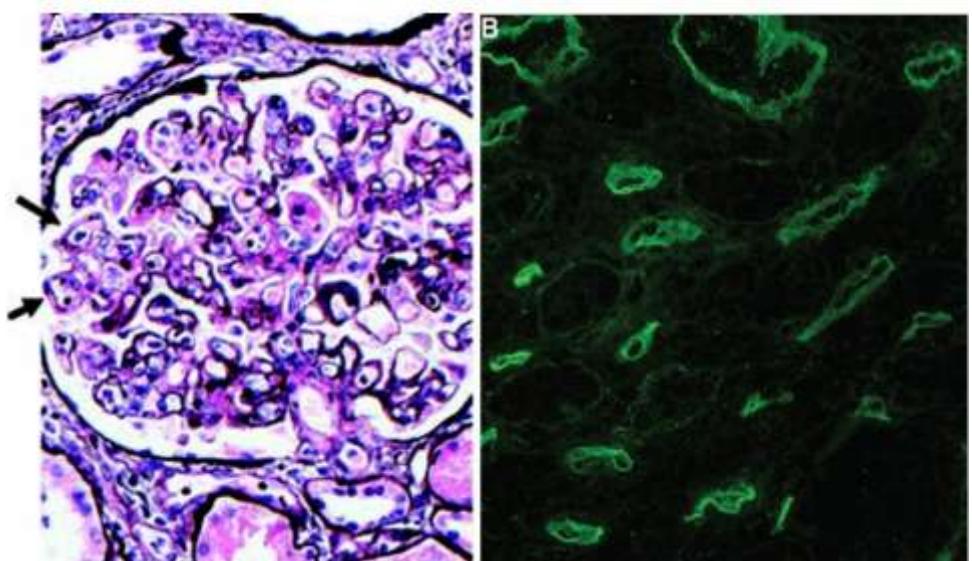
immunologiques (FIAT) et ces distinctions permettent de mettre en place un traitement adapté au mécanisme de rejet en cours. La définition de la FIAT a également évolué car des lésions de FIAT, d'origine immunologique, ont également été observées.

## **II- Le rejet chronique humoral actif**

L'implication des anticorps anti-HLA DSA dans les phénomènes de lésion et du rejet de greffe est une notion apparue dès 1969 (Morris et al. 1969). En 1991, le rejet hyperaigu est défini dans la classification de Banff comme étant un « rejet dont la cause présumée est la présence d'anticorps préformés, normalement caractérisé par une accumulation polymorphe dans les capillaires glomérulaires et péritubulaires à une heure post-transplantation, avec des lésions endothéliales et des thromboses capillaires subséquentes » (Solez et al. 1993). Ce n'est qu'en 2005 que le terme d'AMR chronique actif est introduit dans la classification et reconnu comme une véritable catégorie de rejet chronique possédant des caractéristiques histologiques et sériques définies.

### **1- Définition de l'AMR chronique actif**

Le rejet chronique humoral actif est défini cliniquement par un déclin de la fonction rénale, une hypertension artérielle et l'apparition d'une protéinurie. Les caractéristiques histologiques comprennent un ou plusieurs des facteurs suivants : un dédoublement de la membrane basale glomérulaire, une multilamellation des capillaires péritubulaires, une fibrose interstitielle et atrophie tubulaire et/ou un épaissement intimal des artères. Ces lésions capillaires, vasculaires et glomérulaires chroniques doivent être accompagnées de dépôts de C4d dans le greffon, ainsi que d'anticorps anti-HLA donneur-spécifiques, sinon il s'agit d'une suspicion d'AMR chronique actif. Ainsi 91% des biopsies pour cause présentant un épaissement des membranes basales sont associées à une multilamellation des capillaires péritubulaires, 36% contiennent des dépôts de C4d et 70% présentent des anticorps anti-HLA dont 85% sont DSA (Solez et al. 2007). La Glomérulopathie du Transplant est la lésion glomérulaire de l'AMR chronique actif.



**Figure 5: Caractéristiques de la GT.**

(A) Duplication de la membrane basale glomérulaire (flèches) (F G Cosio et al. 2008). (B) Marquage C4d autour des PTC en immunofluorescence (Robert B Colvin 2007).

## 2- Anticorps anti-HLA

### a- La Théorie humorale de la Transplantation

Un rein transplanté chez un patient ayant des anticorps anti-HLA DSA préformés est détruit en quelques minutes. Le seul moyen de détecter l'immunisation d'un patient contre son greffon est la présence d'anticorps anti-HLA. Des anticorps et du C4d précédent presque tous les rejets aigus et chroniques. C'est en se basant sur ces observations que Terasaki élabora en 2003 la Théorie Humorale de la Transplantation (Terasaki 2003), selon laquelle tous les rejets, qu'ils soient aigus ou chroniques, sont engendrés par des anticorps. Bien que n'étant en réalité pas responsables de l'ensemble des rejets, notamment des rejets purement cellulaires, les anticorps ont une place cruciale dans l'AMR aigu et chronique actif et donc dans la Glomérulopathie du Transplant (GT). Cependant cette observation soulève de nombreuses questions, particulièrement sur l'influence du développement pré- ou post-greffe des anticorps, la signification des anticorps détectés par les technologies de pointe mais non détectés en crossmatch conventionnel, la classe des molécules HLA ciblées ou encore le rôle des IgM DSA (Takemoto et al. 2004). De plus, certains anticorps pourraient avoir des effets protecteurs vis-à-vis du greffon, mais cette notion est encore controversée (Ponticelli 2010).

### **b- Anticorps préformés et de novo**

Les anticorps préformés corrèlent significativement avec une diminution de la survie du greffon à long terme, dû à une augmentation de l'incidence d'AMR chez les patients (Lefaucheur et al. 2009), et des techniques sont mises en œuvre afin de les éliminer ou de faire diminuer leur taux avant la greffe. Il a été montré récemment que l'utilisation d'un traitement prophylactique composé d'une quadrithérapie standard (ATG ou Basiliximab + Csa ou Tacrolimus + MMF + Prednisone) associée à des IVIg, des plasmaphérèses et un anti-CD20 dès le jour de la greffe chez des patients immunisés diminue significativement le taux d'anticorps anti-HLA DSA, le score des lésions chroniques ainsi que le développement d'AMR chronique actif à un an (Loupy et al. 2010).

Le développement de novo d'anticorps anti-HLA DSA se produit à des temps variables post-transplantation. Sur une cohorte de 78 patients transplantés, 35 ont développé des DSA de novo, 22 ont perdu leurs anticorps DSA entre 3 et neuf mois post-transplantation, tandis que 11 patients en ont développé pendant la même période (Banasik et al. 2007). Plus de la moitié des patients qui développent des DSA post-transplantation rejettent le greffon, à cause d'anticorps anti-HLA de classe I, ou de classe I et II combinées (Fernández-Fresnedo et al. 2003). La survenue d'un rejet aigu est un facteur de risque pour la survie à long terme du greffon, cependant, le nombre d'épisodes de rejets ne corrèle pas avec la sévérité des lésions chroniques de Glomérulopathie du Transplant (Palomar et al. 2005).

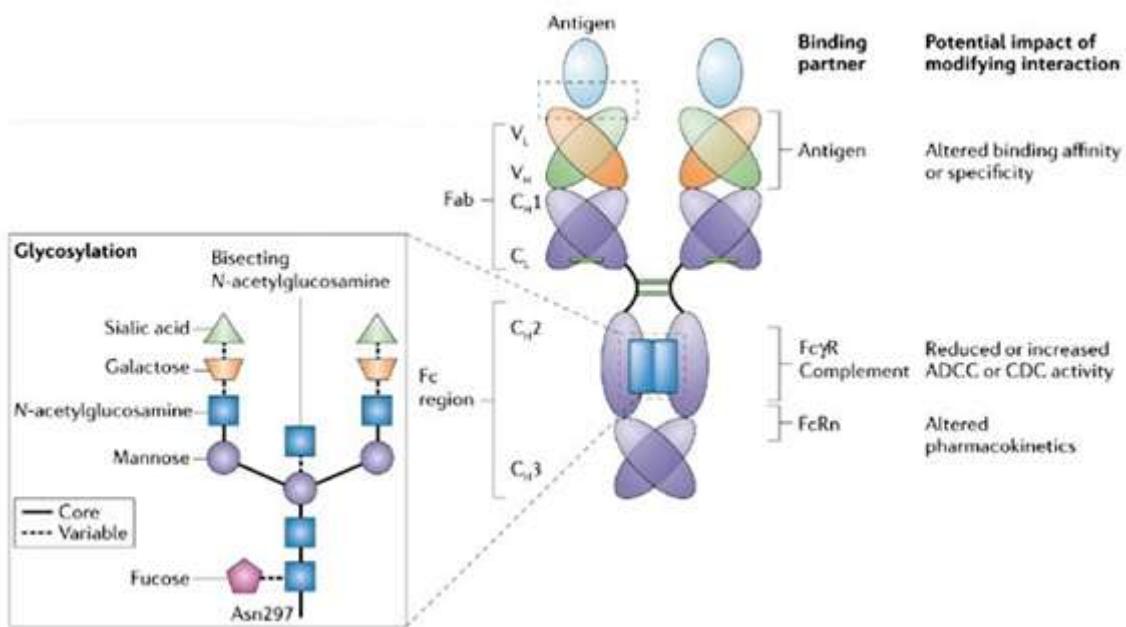
D'autre part, on note une augmentation du nombre de DSA circulants chez des patients de retour en hémodialyse, ou qui ont subi une néphrectomie suite à un échec de la greffe. Ces anticorps n'étaient pas ou peu détectés avant le rejet de greffe et étaient potentiellement adsorbés par le greffon (Marrari et al. 2010).

### **c- Isotypes et glycosylation d'anticorps**

Les IgG1 et IgG3 activent le complément, contrairement aux IgG2 et IgG4. C'est pourquoi déterminer l'isotype des anticorps anti-HLA DSA pourrait expliquer pourquoi les survies de greffons et la survenue de rejets sont si variables au sein des populations transplantées. L'équipe de Lobashevsky a démontré que lorsque l'on transplante un patient ayant un cross-match B positif, si les DSA développés post-greffe sont principalement de type non activateur du complément, on observe une bonne survie du greffon à long terme. Le succès de la greffe est donc dépendant du ratio  $(\text{IgG2} + \text{IgG4}) / (\text{IgG1} + \text{IgG3})$  ainsi que de l'intensité

moyenne de fluorescence (MFI) des obtenue pour les IgG1 qui ne doit pas dépasser un certain seuil (Lobashevsky et al. 2010). Cependant il a été montré que l'isotype des IgG fixées sur les cibles HLA, de même que leur quantité corrèle très peu avec la survenue d'une cytotoxicité dépendante du complément. En revanche, la présence simultanée de deux anticorps monoclonaux dirigés contre deux épitopes différents d'une même molécule HLA induit significativement un dépôt de C3b, molécule issue du clivage du composant C3 de la voie du complément (Kushihata et al. 2004a). L'influence de l'isotype des IgG DSA sur la survenue d'une Glomérulopathie du Transplant est donc toujours discutée.

C'est par leur domaine Fc que les immunoglobulines engagent des récepteurs cellulaires particuliers, traduisant la spécificité de la reconnaissance de l'antigène en réponse *in vivo*. Les immunoglobulines portent en position Asn 297 un groupement glycannique, indispensable à la fixation de la partie constante de l'anticorps aux récepteurs Fcgamma (Figure 6). Le glycanne de base est composé d'un heptapolysaccharide biantenné contenant un N-acétylglucosamine et du mannose, qui peuvent être accompagnés d'un groupement fucose, d'un groupement N-acétylglucosamine supplémentaire, de galactose et/ou d'un groupement acide sialique terminal. La forme complète du glycanne n'est présente que sur 5% des IgG totales du sérum (Kaneko et al. 2006). La sialylation, c'est-à-dire l'ajout d'un ou plusieurs groupements d'acide sialique, augmente le pouvoir anti-inflammatoire des immunoglobulines, notamment des IVIg (Anthony et al. 2008), (Anthony et al. 2008). Une immunisation répétée par un antigène augmente la fucosylation des anticorps (Gornik et al. 1999), ce qui entraîne une diminution de la cytotoxicité médiée par les anticorps (ADCC) (Scallon et al. 2007).



**Figure 6: Structure et glycosylation des immunoglobulines (Paul J Carter 2006)**

Les fragments constants des immunoglobulines portent en position Asn 297 un glycanne indispensable à leur fixation sur les FcR. Des groupements fucose, N-acetylglucosamine, galactose et acide sialique peuvent s'ajouter à la structure basale d'heptapolysaccharide biantenné

#### d- Classe et influence des molécules HLA ciblées

Plusieurs études ont montré que les lésions d'AMR chronique actif sont plus fréquemment associées au développement de novo d'anticorps anti-HLA de classe II, ou d'anticorps anti-HLA de classe I et II combinées, que d'anticorps anti-HLA de classe I seuls (Sis et al. 2007). En revanche, les patients immunisés possèdent plus d'anticorps anti-HLA de classe I, ou de classe I et de classe II combinées que d'anticorps anti-HLA de classe II seuls suite à un échec de greffe.

Des travaux réalisés sur les anticorps anti-HLA montrent qu'une lésion vasculaire, une artériosclérose, est observée chez des souris immunodéficientes, transplantées avec une artère mésentérique humaine puis injectées avec un anticorps anti-HLA de classe I (Galvani et al. 2009).

De plus, une immunisation avec des anticorps anti-HLA de classe I chez des souris immunodéficientes augmente la production de facteurs de croissance et corrèle avec une surexpression de gènes pro-apoptotiques (Nath et al. 2010).

#### **e- La notion d'épitopes**

Une étude a été réalisée sur le cas clinique d'une patiente ayant développé une AMR suite à une immunisation contre des antigènes HLA de classe II (Thaunat et al. 2009) . Cette patiente a en effet développé un panel d'anticorps dirigés contre plusieurs antigènes DP. Or lors de la greffe, l'organe transplanté ne comportait qu'une seule incompatibilité sur un antigène DP. Une analyse détaillée des antigènes a mis en évidence un épitope commun à tous, également présent sur l'antigène incompatible.

Les patients en attente d'une nouvelle greffe présentent en principe un panel d'anticorps dirigés contre plusieurs molécules HLA, majoritairement de classe I (Piazza et al. 2006), certaines portées par leur greffon précédent, d'autres non. Les antigènes les plus répandus de la classe II sont les antigènes DQ, car ils partagent de nombreux épitopes, aussi bien sur leur chaîne bêta que sur leur chaîne alpha, ou parfois issus de l'association d'une chaîne alpha et une chaîne bêta particulières (Barabanova et al. 2009). Les gènes DRB2, 3 et 4, codant pour les antigènes DR51, 52 et 53 sont rarement compatibles entre donneur et receveur, et sont ainsi souvent la cible d'anticorps DSA. Cependant, ces antigènes ont un épitope qui leur est spécifique (Duquesnoy et al. 2008). Les anticorps anti-DRB1 sont peu fréquents car ils constituent un critère important de compatibilité lors du choix du greffon, de même que les anticorps anti-HLA de classe I. Le HLA Matchmaker est un logiciel qui a été développé afin de prédire les antigènes portant les épitopes qui risqueraient d'être reconnus par la personne transplantée, en fonction des séquences alléliques des molécules HLA du donneur et du receveur. Ce système permettrait donc d'éviter le développement d'anticorps anti-HLA DSA de novo et ainsi le développement de lésions chroniques et de Glomérulopathie du Transplant.

#### **f- Anticorps anti-MICA et non HLA**

Les anticorps anti-HLA ne sont pas les seuls anticorps développés suite à une transplantation. Des anticorps préformés anti-MICA ont été observés chez des patients en attente de greffe, toutefois leur présence ne corrèle pas avec une baisse de survie du greffon (Lemy et al. 2010). De plus, des anticorps auto-immuns anti-K alpha 1 tubuline (KAT1), anti-protéines de la matrice extracellulaires et anti-collagène V ont été détectés chez des patients transplantés d'un poumon, suite au développement d'anticorps anti-HLA (Nath et al. 2010). D'autres anticorps ont été mis en évidence suite à une transplantation rénale. Ils sont

dirigés contre des protéoglycans à héparanes sulfates, l'agrine chez l'homme (Joosten et al. 2005) et contre le perlecan chez le rat (Joosten et al. 2002). Le développement d'anticorps contre ces protéines spécifiques pourrait ainsi constituer un élément supplémentaire de suivi post-greffe et de diagnostic d'un AMR chronique.

#### **g- Notion d'accommodation**

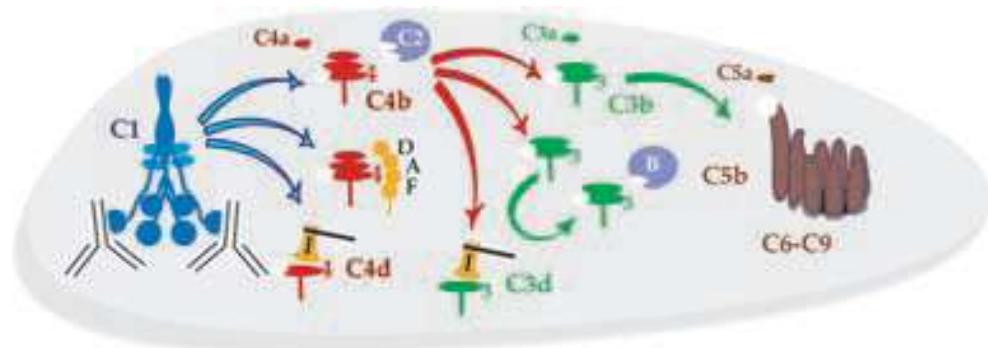
Bien que la présence d'anticorps anti-HLA DSA corrèle avec une incidence élevée d'épisodes de rejets et une diminution significative de la survie des greffons, certains patients développent des anticorps DSA qui n'induisent aucun rejet. Parmi les nombreux paramètres qui pourraient expliquer ces variations interindividuelles vis-à-vis du potentiel agressif des DSA, le titre des anticorps est un facteur probable (B D Tait et al. 2010). En effet, après plasmaphérèse puis transplantation de patients pré-immunisés, ceux possédant des taux faibles d'anticorps anti-HLA DSA circulants ne présentent aucun rejet aigu, contrairement à des patients présentant des taux élevés de DSA post-greffe (Rob Higgins et al. 2007). Ces résultats se limitent cependant à un suivi d'un mois et ne donnent pas d'indications sur le devenir à long terme du greffon. Une seconde voie potentielle d'accompagnement a été mise en évidence lors de transplantations cardiaques pédiatriques, ABO-incompatibles (Urschel et al. 2010). Sur la cohorte de 22 enfants transplantés, seuls les patients les plus âgés ont développé des anticorps anti-HLA de classe II DSA. L'hypothèse avancée est que le système de présentation antigénique indirect (via les molécules HLA de classe II) serait immature chez les plus jeunes enfants qui n'arriveraient donc pas à développer une réponse humorale spécifique puissante sous immunosuppression. De plus, ces enfants ne développent pas non plus d'anticorps DSA contre le groupe sanguin du donneur, et cette absence de réaction persiste au cours du temps.

### **3- Les dépôts de C4d**

#### **a- La voie classique du complément**

Les anticorps activent le système du complément par la voie classique (Figure 7). C1, qui initie l'activation de cette voie classique, est un complexe de trois protéines : C1q, C1r et C1s. Ce complexe possède des fonctions enzymatiques : C1q se lie aux anticorps, permettant le clivage de C4 par C1r et C1s, produisant ainsi 2 fragments : C4a et C4b. Le fragment C4a est un médiateur soluble et le fragment C4b subit une modification structurale, qui expose un groupe thioester, lui conférant la capacité de former des liaisons covalentes avec un groupe

amine ou hydroxyle de la plus proche protéine. Le C4b lié de façon covalente permet l'ancrage de C2, rendant possible son clivage par C1s pour générer du C2b qui diffuse et du C2a qui reste associé au C4b. Le complexe C4b-C2a forme la C3 convertase, qui clive la molécule C3 en C3a et C3b. La C3b peut à son tour former des liaisons thioester avec les protéines avoisinantes. Le nouveau complexe C4b-C2a-C3b forme la C5 convertase qui clive le C5 en C5a et C5b. Les molécules C5b, C6, C7, C8 et C9 s'assemblent ensuite sans étape de clivage pour former le complexe d'attaque membranaire, capable de percer les cellules (Janeway et al. 2003).



**Figure 7: Activation et régulation de la voie classique du complément (William M Baldwin et al. 2004)**

Le C1 se lie aux anticorps par les têtes globulaires de C1q, permettant aux enzymes C1r et C1s de cliver le C4 en fragments C4a et C4b. C4b se lie à la surface cellulaire où trois possibilités se présentent: l'activation des éléments suivants de la cascade, la régulation par dissociation ou par clivage. Dans le premier cas, le C4d fixe le C2 qui est alors clivé par C1s pour générer la convertase C3 de la voie classique. Le C3 est alors clivé en C3a qui diffuse et C3b qui se fixe à la surface cellulaire. Dans le second cas, C4b peut être régulé par le facteur DAF (Decay Accelerating Factor) qui dissocie C4b et C2a. Enfin, le facteur I clive le C4b jusqu'à son produit final, C4d, qui reste associé à la surface de la cellule. C4d est une molécule inactive qui stoppe la cascade. Le facteur I peut également cliver le C3b pour obtenir du C3d. Le C3b qui échappe à la régulation peut former une C3 convertase alternative avec le facteur B et initier une boucle d'amplification augmentant significativement la quantité de C3b à la surface des cellules. Le C3b sert donc de composant de la C5 convertase dans les deux voies, pour cliver le C5 en C5a et C5b. Pour terminer, le C5b initie l'assemblage du complexe d'attaque membranaire avec le C6, C7, C8 et C9.

La régulation du complément se fait par deux mécanismes principaux qui sont la séparation des composants du complexe et le clivage de ces mêmes composants par des régulateurs. Le facteur I clive le C4b et le C3b en une succession de fragments biologiquement actifs, dont les produits finaux sont le C4d et le C3d, inactifs mais restant fixés à la surface des cellules (Baldwin et al. 2004).

Les fragments issus de l'activation de la voie du complément ont la capacité d'induire directement des lésions au greffon. Le C1q induit la production de cytokines et chimiokines par le biais de récepteurs spécifiques (van den Berg et al. 1998) et permet la maturation des

cellules dendritiques en provoquant la translocation du facteur de transcription NF-κB au noyau (Nayak et al. 2010). Les molécules C4b, C3b et iC3b induisent des signaux pro-inflammatoires via les récepteurs CR1 et CR3 (Baldwin et al. 1995). Les anaphylatoxines C3a et C5a augmentent la perméabilité vasculaire, l'activation des cellules endothéliales, engendrent des dépôts de fibrine et des signaux chimiотactiques (Baldwin et al. 1995). De plus, le complexe terminal C5b9 contribue au relargage de métabolites réactifs à l'oxygène, à la production de cytokines, à l'activation des plaquettes et à l'engagement des facteurs de coagulation (Morgan 1998).

#### **b- Marquage et détection du C4d**

Le C4d est un marqueur qui se fixe par des liaisons covalentes stables à la cellule cible. Dans les premiers essais peu concluants de détection du C4d, l'anticorps utilisé était un anticorps polyclonal qui ciblait la molécule C4c et non la portion  $\alpha$ 2 du C4 (le C4d) (Feucht 2003). Le C4d a été choisi comme marqueur des AMR pour plusieurs raisons. D'une part, le tissu rénal naïf contient peu de C4d, tandis que le C3d est retrouvé dans les tubules de la membrane basale et le mésangium. D'autre part, le C4d diminuerait les réactions de faux-positif dues à l'activation de la voie alterne du complément (Baldwin et al. 2004).

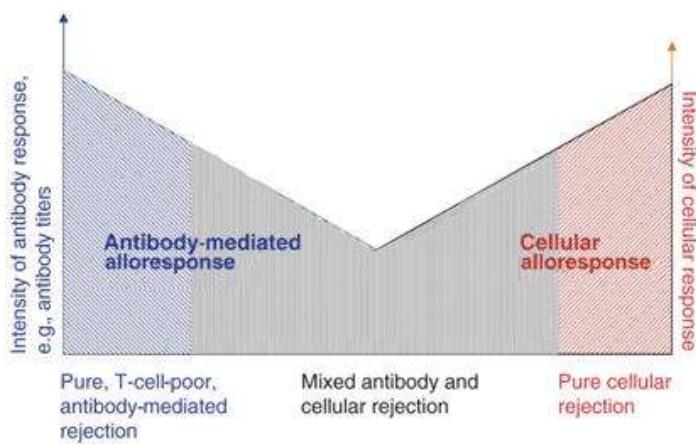
Aujourd'hui le C4d peut se détecter par immunofluorescence (IF) sur tissu congelé ou par immunohistochimie (IHC) sur des coupes de tissu en paraffine. Les deux techniques présentent des variations de marquage (Colvin 2007). En effet, sur un groupe de 26 marquages diffus en IF, 8% sont minimes en IHC et seraient considérés comme négatifs. Sur les marquages focaux en IF, 52% sont négatifs en IHC (Seemayer et al. 2007). Wahrmann et son équipe ont mis au point une nouvelle technique de détection de l'activation du complément par les anticorps anti-HLA (Wahrmann et al. 2005). Cette technique est basée sur les single antigen beads qui sont incubées avec le sérum du patient, puis après lavage avec un sérum dépourvu d'anticorps anti-HLA mais possédant les composants du complément. Les billes sont alors révélées avec un anticorps anti-C4d couplé et l'acquisition est réalisée sur un cytomètre de flux. Cette technique appelée C4d Flow PRA Screening est plus spécifique que la CDC PRA (Panel Reactive Antibodies). Elle est cependant moins sensible, probablement parce qu'elle ne détecte que les anticorps anti-HLA contrairement à la technique du CDC.

### c- Corrélations C4d et AMR chronique actif

Le facteur différenciant les rejets à médiation cellulaire des rejets à médiation humorale est le C4d, c'est pourquoi il a été choisi comme marqueur du rejet chronique humorale actif. Il est induit par la fixation des anticorps sur les cellules du greffon. Cependant, un nombre croissant d'études montre que la corrélation n'est pas parfaite entre le C4d et l'AMR chronique actif.

On détecte très peu de marquage C4d linéaire dans les capillaires glomérulaires (6% des biopsies C4d positives) en revanche, le marquage C4d des capillaires péri-tubulaires corrèle avec les signes histologiques de la Glomérulopathie du Transplant (GT), notamment la multilamellation de la membrane des PTC (Regele et al. 2002). Si le marquage C4d est présent sans signes histologiques, il est prédictif d'une GT. Cependant, seulement la moitié des cas de GT présentent un dépôt de C4d sur les PTC, et l'histologie est identique entre les biopsies de GT C4d positives et C4d négatives (Mauiyyedi et al. 2001). De plus, ce facteur fluctue au cours du temps, pouvant être positif sur une biopsie puis négatif sur la biopsie suivante, ou l'inverse (Regele et al. 2002).

Nickeleit et son équipe (Nickeleit et al. 2007) ont montré que les dépôts de C4d ne définissent pas toujours de « pures » AMR, mais souvent un type mixte d'AMR et de TCMR (Figure 8). Ces résultats montrent qu'un marquage C4d est détecté dans 20-30% des rejets cellulaires tubulointerstitiels (Banff grade 4I), dans 40-50% des endoartérites (Banff grade 4II) et dans 60% des glomérulites (Banff grade 2III). Il a en effet été montré que 67% des patients ayant un rejet cellulaire aigu présentent du C4d sur les biopsies de leur greffon (Schmeding et al. 2006).



**Figure 8: rejet aigu de type AMR, TCMR ou mixte (V Nickeleit et Andreoni 2007)**

Les lésions histologiques observées chez les patients en rejet aigu montrent que les rejets ne sont pas toujours de « pures » AMR ou TCMR mais présentent des caractéristiques des deux types simultanément.

L'étude réalisée par Scornick démontre que la quantité de C4d déposée à la surface des cellules corrèle avec la quantité totale d'anticorps anti-HLA DSA de type IgG, cependant la corrélation n'existe plus s'il s'agit de non DSA ou d'IgM (Scornik et al. 2007).

#### **d- Les autres composants de la voie classique du complément**

Certains des autres composants de la voie classique du complément se fixent par des liaisons covalentes aux protéines des cellules environnantes et peuvent être détectés par marquage. Le premier composant de la voie classique du complément, le C1q, change de conformation lorsqu'il se lie aux cellules et crée ainsi des néoépitopes. Ce changement conformationnel engendre la production d'anticorps pouvant induire des maladies autoimmunes telles que le lupus (Bigler et al. 2009).

D'autre part, l'équipe de Roher a mis en évidence un rôle important du médiateur soluble C5a dans la survenue des rejets. En effet, l'utilisation d'un anticorps monoclonal anti-C5a associé à un traitement par Cyclosporine A et LF15-195 prévient le développement de l'AMR chez des souris pré-immunisées, tandis que le traitement par CsA ou LF15-195 seul ne prolonge pas significativement la survie des souris (Rother et al. 2008). Cette observation est faite malgré la présence de DSA chez les souris des deux groupes.

### **III- La fibrose interstitielle et atrophie tubulaire**

#### **1- Définition de la Fibrose Interstitielle et Atrophie Tubulaire**

En 1991, la fibrose interstitielle et l'atrophie tubulaire étaient deux lésions entrant dans la définition de Banff, utilisées afin d'évaluer l'importance de la Néphropathie Chronique d'Allogreffe. Elles ont été regroupées en 2005 sous le terme de Fibrose Interstitielle et Atrophie Tubulaire afin de remplacer l'ancienne dénomination de Néphropathie Chronique du Transplant, utilisée à tort comme une pathologie précise. La FIAT représente une lésion ayant une origine non immunologique identifiée ou non et pouvant être observée seule sur le greffon, ou en présence de lésions humorales. La classification de Banff de 2005 cite parmi les causes non immunologiques induisant une FIAT l'hypertension artérielle, des infections virales (CMV) ou bactériennes (pyélonéphrite), des obstructions chroniques, il est également admis que les épisodes de rejet aigu participent à la FIAT. Des données récentes indiquent aujourd'hui que certaines FIAT pourraient avoir une origine immunologique. La sévérité de la

FIAT est fonction du pourcentage de cortex rénal atteint. La fibrogénèse est un processus naturel de réparation des tissus lésés, toutefois sa progression chez les patients transplantés est rapide la première année et corrèle avec une dégradation de la fonction rénale à long terme (Nankivell et al. 2003). L'enjeu pour cette lésion est de déterminer les facteurs induisant la fibrose dans le but de développer des traitements spécifiques pouvant limiter l'expansion de la fibrose interstitielle et préserver la survie du greffon à long terme.

## **2- Difficultés d'évaluation de la fibrose**

Le score de fibrose interstitielle est défini en fonction du pourcentage de surface qu'elle occupe dans le cortex rénal. L'analyse est réalisée par observation au microscope de lames marquées. Les résultats sont peu reproductibles d'un laboratoire à l'autre, et d'un observateur à l'autre car la quantification est subjective. L'utilisation de colorants marquant spécifiquement les collagènes fibrillaires, principaux constituants de la fibrose interstitielle, ainsi que des méthodes d'acquisition et de quantification automatisés de la fibrose sont en cours d'étude et offrent une bonne reproductivité des résultats (Servais et al. 2009). Ils doivent maintenant être améliorés afin d'être accessibles à tout anatomopathologiste.

Récemment, une équipe allemande a proposé l'utilisation d'une méthode non invasive pour évaluer la fibrose des greffons rénaux, l'élastographie transitoire. Cette technique basée sur des vibrations de basse fréquence et d'amplitude faible qui engendre une onde spécifique se propageant dans les tissus. Une acquisition par ultrasons est alors utilisée pour suivre l'onde et ainsi déterminer la dureté du tissu. Les résultats suggèrent que la dureté du parenchyme mesurée reflète la fibrose du transplant. Les auteurs préconisent donc d'utiliser cette technique pour le suivi du greffon, dans le but d'aider à la décision de pratiquer une biopsie en cas de dégradation du greffon (Arndt et al. 2010). Bien que non invasive, cette technique a l'inconvénient de ne pas détecter de changements aussi précis que les modifications infracliniques, détectées par les biopsies protocolaires.

## **3- Facteurs fibrosants**

L'identification de l'origine de la FIAT sur des biopsies est souvent difficile, cependant l'amélioration des techniques d'histologie permet de plus en plus de déterminer la cause de la fibrose. Ainsi sur une cohorte de 47 patients, 81% des biopsies présentant une FIAT pure ont pu être attribuées à des causes spécifiques : 23.5% ont pour cause une néphropathie à polyomavirus, 28% ont une cause immunologique, 15% sont dues à une pyélonéphrite

récurrente, 8.5% sont provoquées par une fonction marginale du greffon, 4% sont la conséquence d'une sténose urétérale persistante et enfin 2% sont induites par une toxicité des inhibiteurs de la calcineurine (El-Zoghby et al. 2009). Les pathologies citées ci-dessus sont une source connue de fibrose mais les mécanismes précis mis en jeu ne sont pas totalement définis. Toutefois, plusieurs facteurs fibrosants ont été proposés au cours des dernières années et pourraient devenir les cibles de traitements visant à limiter la progression de la fibrose.

Parmis les facteurs pro-fibrotiques se trouvent les inhibiteurs de la calcineurine, Cyclosporine A et Tacrolimus. Il a été observé que leur utilisation à long terme est néphrotoxique et corrèle avec une augmentation du score de la fibrose des greffons par rapports aux autres molécules immunosuppressives. C'est pourquoi plusieurs protocoles visant à réduire, voire éliminer les inhibiteurs de la calcineurine ont été mis en place et sont encore à l'essai (Djamali et al. 2009).

Le système Rénine-angiotensine est un autre candidat fibrosant. En effet, le système Rénine-Angiotensine-Aldostérone est un système endocrine responsable de la régulation de la pression sanguine systémique ainsi que de l'homéostasie aqueuse et saline (Burnier et al. 2006). Il a été montré que l'angiotensine II stimule des voies de signalisation profibrotiques en augmentant la synthèse de collagène et de fibronectine, en partie via une production endogène de facteurs mitotiques, tels que le TGF- $\beta$ , le PDGF et l'endothéline 1 (Touyz 2005).

Le Connective Tissue Growth Factor (CTGF) est également intéressant (Djamali et al. 2009). Ce facteur est un composant de la voie du TGF $\beta$  (Tumor Growth Factor bêta) et possède la capacité d'induire la prolifération des fibroblastes et la synthèse de collagène. Son rôle exact n'est pas connu mais la quantité de CTGF dans les urines corrèle avec le degré de FIAT du greffon. L'intérêt de ce facteur est qu'il se situe en aval du TGF $\beta$  et permettrait de cibler plus précisément cette voie de fibrose, plutôt que de bloquer directement le TGF $\beta$  impliqué dans de nombreuses voies physiologiques (Mannon et al. 2010).

Le stress oxydatif est une voie importante de fibrose et constitue une cible privilégiée de traitement thérapeutique (Fine et al. 2008). Un modèle de souris où les reins greffés ont subi 30 minutes d'ischémie bilatérale avant la reperfusion, a montré que le phénomène d'ischémie-reperfusion augmente significativement l'expansion interstitielle, la synthèse de

collagène, l'apoptose des cellules épithéliales tubulaires ainsi que la production d'espèces réactives à l'oxygène. L'ischémie-reperfusion contribue donc au développement d'une fibrose chronique du greffon en association avec une augmentation du stress oxydatif. Ces effets sont annulés en traitant les animaux par une manganèse (III) tetrakis (1-methyl-4-pyridyl) propyrine (MnTMPyP), molécule mimant une superoxyde dismutase (Kim et al. 2009). D'autre part, les enzymes nicotinamide adénine dinucléotide (NADPH) oxydase (Nox), dont Nox-2 est une sous-unité, sont une source importante d'espèces réactives à l'oxygène dans le rein. Il a été montré que Nox-2 est sur-régulée en présence de stress oxydatif, et qu'elle colocalise avec l'alpha smooth muscle actin, un marqueur de la transition épithéliomésenchymateuse (Djamali et al. 2009).

#### **4- La théorie de la transition épithéliomésenchymateuse (EMT)**

Sur les biopsies de patients présentant une FIAT, les cellules épithéliales tubulaires perdent leurs marqueurs épithéliaux que sont la E-cadhérine et la cytokératine. Environ 30% de ces cellules acquièrent une expression de vimentine et de S100A4, qui sont des marqueurs de tissu mésenchymal (Vongwiwatana et al. 2005). Ce phénomène n'est pas retrouvé sur les biopsies protocolaires de patients ayant une fonction rénale stable dans la même période post-transplantation.

Un mécanisme possible de fibrose qui pourrait être une voie « classique » après dommage tubulaire serait donc la transition épithéliomésenchymale (EMT), où les lésions des tubules (immuns ou non) les conduisent à perdre leur phénotype épithelial et à acquérir un phénotype de myofibroblastes activé qui migre dans l'interstitium pour produire des molécules profibrotiques (Vongwiwatana et al. 2005).

Les cellules épithéliales qui entrent en EMT cessent leur fonction épithéliale et produisent du collagène, provoquant l'épaississement de la membrane basale tubulaire. Cette hypothèse permet d'expliquer l'atrophie tubulaire observée lors de la FIAT. De plus, l'intensité du score d'EMT est significativement corrélée avec la progression du score de fibrose interstitielle entre 3 et 12 mois post-transplantation (Rondeau et al. 2009). L'ischémie (et son médiateur intracellulaire HIF-1a) est un puissant inducteur d'EMT, de même que l'inflammation et les inhibiteurs de la calcineurine (Cornaire et al. 2010). Cette théorie de l'EMT fournit alors un lien entre les causes connues de fibrose, telles que l'inflammation ou les inhibiteurs de la calcineurine, et la fibrose interstitielle et atrophie tubulaire observées histologiquement (Figure 9).

Cependant, plusieurs articles de la littérature opposent des arguments contraires à la théorie de l'EMT. Il a notamment été montré que des cellules épithéliales tubulaires, bien que capables d'exprimer le marqueur « alpha smooth muscle actin » in vitro lorsqu'elles sont stimulées par le TGF $\beta$ , ne migrent pas *in vivo* dans l'interstitium et ne produisent pas de collagène lorsqu'elles sont lésées (Cook 2010). D'autres études sont donc nécessaires afin de déterminer les processus précis de fibrose.

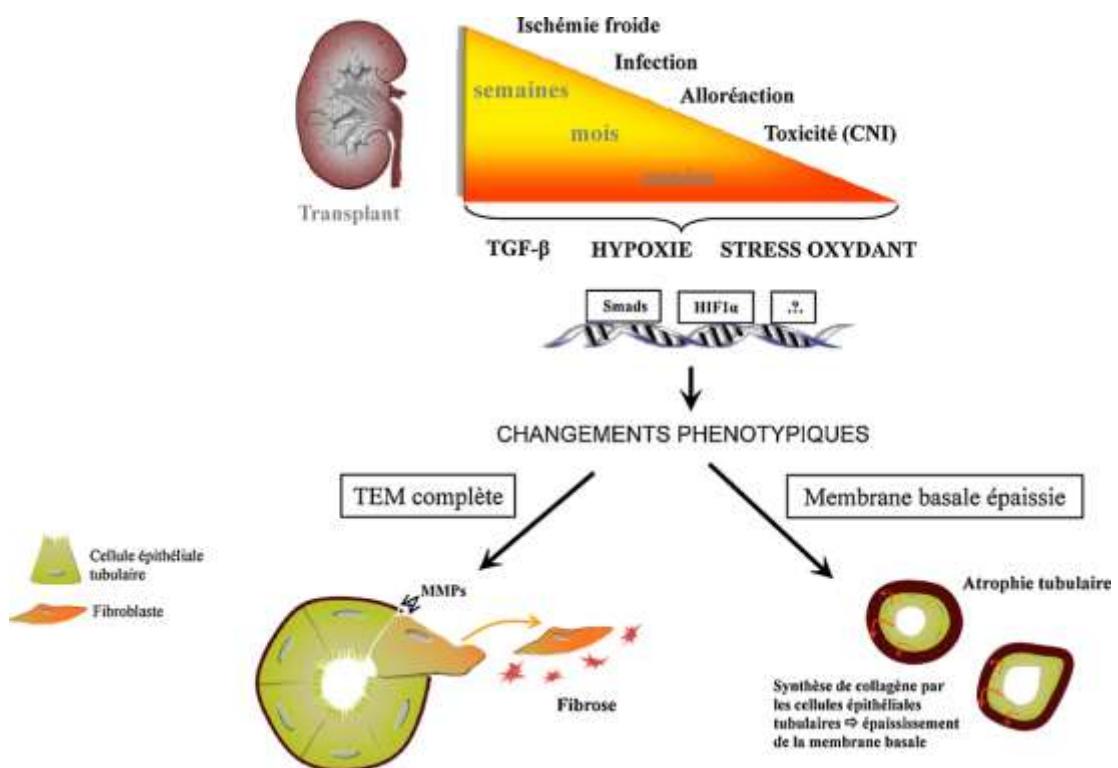


Figure 9: déroulement de la transition épithéliomésenchymateuse (Cornaire et al. 2010)

La transition épithéliomésenchymateuse est induite par des facteurs fibrosants tels que l'ischémie-reperfusion ou le stress oxydatif et engendre des changements phénotypique des cellules épithéliales tubulaires. Ces dernières présentent un phénotype mésenchymateux et acquièrent la capacité de migrer vers l'interstitium et d'induire la synthèse de collagène.

# **Chronologie et biomarqueurs du rejet chronique**

## **I- Les biopsies protocolaires : indicateurs du déroulement d'un rejet de greffe**

Le diagnostic des AMR chroniques actifs se fait actuellement à partir de biopsies du greffon, qui sont le plus souvent réalisées lorsqu'un problème clinique est constaté. Elles sont par exemple pratiquées en cas de retard de reprise de fonction du greffon, ou lors de l'apparition d'une protéinurie chez le patient. Ces biopsies mettent en évidence des signes histologiques de lésion du greffon. De plus en plus de centres de transplantation intègrent dans le suivi du patient des biopsies réalisées à des temps définis, que l'on trouve dans la littérature sous les termes de biopsies protocolaires, biopsies systématiques ou biopsie de dépistage.

### **1- Bénéfices / Risques des biopsies protocolaires**

La biopsie est un geste invasif qui peut entraîner des conséquences néfastes pour le greffon. De ce fait, la pratique de biopsies répétées chez un patient doit tenir compte des risques encourus pour le greffon par rapport aux bénéfices apportés au patient. Une analyse de la littérature a démontré que les risques engendrés par les biopsies protocolaires sont faibles, et sont de deux ordres :

- Les risques majeurs, qui se produisent sur 1% des biopsies. Ces risques comprennent des saignements, une hématurie avec obstruction de l'uretère et enfin la perte du greffon.
- Les risques mineurs, qui se résolvent sans intervention, comprennent une hématurie (3,5%), un hématome périrénal (2,5%), une fistule artérioveineuse asymptomatique (7,3%) et des réactions vagales (0,5%) (Nankivell et al. 2006).

D'autre part, la pratique des biopsies protocolaires présente un certain nombre d'avantages. En effet, une observation séquentielle des caractéristiques histologiques des greffons apporte des indications sur le déroulement chronologique d'un rejet de greffe. Lorsqu'elles sont pratiquées peu de temps après la transplantation (à 3 mois), elles permettent de mettre en évidence des caractéristiques histologiques de rejet aigu infraclinique. Il s'agit d'un rejet

précoce, dont la prévalence maximale se situe dans les premiers mois suivant la transplantation, qui présente des lésions histologiques caractéristiques de rejet, sans signe clinique et en présence d'une bonne fonction rénale. Les biopsies protocolaires pratiquées à un an peuvent mettre en évidence des signes précoces de FIAT ou de rejet chronique actif.

## 2- Le rejet infraclinique

Deux études ont utilisé des biopsies systématiques à 6, 12 et 26 semaines. La première étude comprend une cohorte de 190 patients transplantés, dont 27 ont développé un rejet infraclinique. Cette étude a montré que les lésions tubulointerstitielles apparaissent tôt et évoluent tout au long des trois biopsies (Schwarz et al. 2005). La deuxième étude porte sur les infiltrats observés sur 833 biopsies protocolaires et 306 biopsies pour cause. Les biopsies protocolaires n'ont révélé aucun rejet aigu bien que 85% des greffons stables biopsiés présentent un infiltrat cellulaire. La prévalence d'infiltrats est identique dans les deux cas, toutefois les biopsies protocolaires présentent plus fréquemment un infiltrat de type nodulaire et les biopsies pour cause montrent surtout un infiltrat de type diffus. La seule caractéristique corrélant avec une diminution de la survie du greffon est une inflammation persistante (Mengel et al. 2007). Ces données démontrent que des rejets infracliniques se produisent très rapidement après la transplantation et qu'ils sont capables d'engendrer des lésions délétères pour le greffon. Il a également été mis en évidence que le rejet infraclinique observé dès 14 jours après la greffe est prédictif du devenir du greffon à 10 ans. Ainsi, la survie du greffon à dix ans est de 62.3% chez les patients présentant un rejet infraclinique, comparé à une survie de 93.7% chez les patients avec des signes de changement « borderline » et 96.2% chez des patients sans rejet (Choi et al. 2005). De même, chez 72% de patients ayant une détérioration histologiques sur une biopsie à 2 ans post-transplantation, on observe un rejet infraclinique sur les biopsies protocolaires 3 mois après la greffe (Legendre et al. 1998).

La prévalence du rejet infraclinique est augmentée chez les patients ayant précédemment développé un épisode de rejet aigu, et diminue parallèlement au score de l'inflammation sous l'influence du traitement immunosuppresseur appliqué. Le rejet infraclinique détecté après trois mois post-transplantation montre des scores de FIAT plus élevés que sur les biopsies des patients ne présentant pas de rejet (Nankivell et al. 2004). Lorsqu'elles sont présentes dès 3 mois après la greffe, les lésions d'AMR infraclinique corrèlent significativement avec une augmentation du taux de GT, du score des lésions de microcirculation et de la FIAT à un an comparativement à des patients dont les biopsies ne

montrent pas de signe histologique (Loupy et al. 2010). De plus, les biopsies effectuées après un an post-greffe corrèlent avec une perte du greffon dans les trois ans tandis que les biopsies réalisées plus précocement aboutissent rarement à un échec de la greffe.

Des biopsies réalisées pour des raisons cliniques ont montré que la présence d'anticorps anti-HLA donneur-spécifiques associée à des modifications de la microcirculation mais sans présence de C4d représente un facteur de risque pour le devenir du greffon (Einecke et al. 2009). Cet AMR C4d négatif a également été observé par d'autres équipes. L'AMR infraclinique C4d négatif serait alors un stade intermédiaire entre un état sans rejet et un AMR infraclinique, potentiellement dû à des anticorps de faible avidité ou incapables de fixer le complément (Loupy et al. 2009). Il est également possible que le rejet infraclinique et le rejet clinique soient la même entité, à un stade différent du processus (Hoffmann et al. 2005). Les différences sont plus quantitatives que qualitatives sur le plan immunophénotypique des cellules infiltrantes.

### **3- Chronologie de la GT**

La chronologie des lésions conduisant à la GT a pu être établie grâce à l'analyse par microscopie électronique de biopsies prélevées à 0, 1, 3, 6, 12 mois puis 2, 3, 4 et 5 ans post-transplantation sur un ensemble de 228 biopsies protocolaires dont 95 GT (n=7 patients) et 133 contrôles (n= 8 patients) (Wavamunno et al. 2007). Ces biopsies révèlent des changements phénotypiques très précoces des cellules endothéliales du glomérule et des capillaires péritubulaires, suivis par une expansion de l'espace subendothélial, avec formation d'une nouvelle Lamina Densa dans le glomérule, et d'une multilamellation des capillaires péritubulaires. Ces modifications s'accompagnent d'anticorps anti-HLA DSA et de dépôts de C4d.

Les changements phénotypiques des cellules endothéliales glomérulaires consistent en une vacuolisation des cellules endothéliales, visible dès le premier mois après la greffe. Puis se produit l'expansion de la Lamina Rara Interna qui crée des interdigitations avec la membrane endothéliale. La multilamellation des membranes basales survient environ un an après la greffe, suivie par la formation de la Lamina Densa entre 3 et 6 ans post-transplantation. Ces changements glomérulaires sont accompagnés par une expansion de la matrice mésangiale et une modification des podocytes. Les modifications microvasculaires débutent par un épaissement et une perte de fenestration des cellules endothéliales des PTC. Puis la multilamellation des membranes des PTC se produit.

Toutefois les anticorps DSA anti-HLA sont fréquemment observés dès un an post-greffe mais ne corrèlent pas systématiquement avec un rejet. En effet, entre quinze et quarante pour cent des patients avec un greffon fonctionnant 3 ans après la greffe présentent également des anticorps anti-HLA DSA (Einecke et al. 2009).

#### **4- Fréquence de la fibrose**

La présence de FIAT à 3 ou 6 mois post-greffe chez des patients possédant une bonne fonction rénale corrèle avec une dysfonction et une perte de greffon tardives. De plus, les patients présentant à la fois une fibrose et une inflammation interstitielle ont plus de risque de développer une dysfonction rénale ou une perte de greffon que les patients présentant une fibrose seule (Rush 2010). Cette notion a également été observée par Snanoudj. En effet, une FIAT associée à une inflammation, de même qu'une fibrose associée à un rejet infraclinique sont des facteurs de risque pour le devenir du greffon (Snanoudj et al. 2008).

Ces données démontrent la valeur informative et prédictive des biopsies protocolaires. Elles permettent de détecter des lésions très précoces du greffon, délétères puisqu'elles corrèlent avec un risque élevé de rejet chronique et de perte de greffon. Des études ont montré qu'il était possible de traiter les rejets infracliniques et ainsi augmenter la survie du greffon. Enfin, ces biopsies ont permis de mieux comprendre la chronologie et la complexité des processus impliqués dans les lésions chroniques (Figure 10).

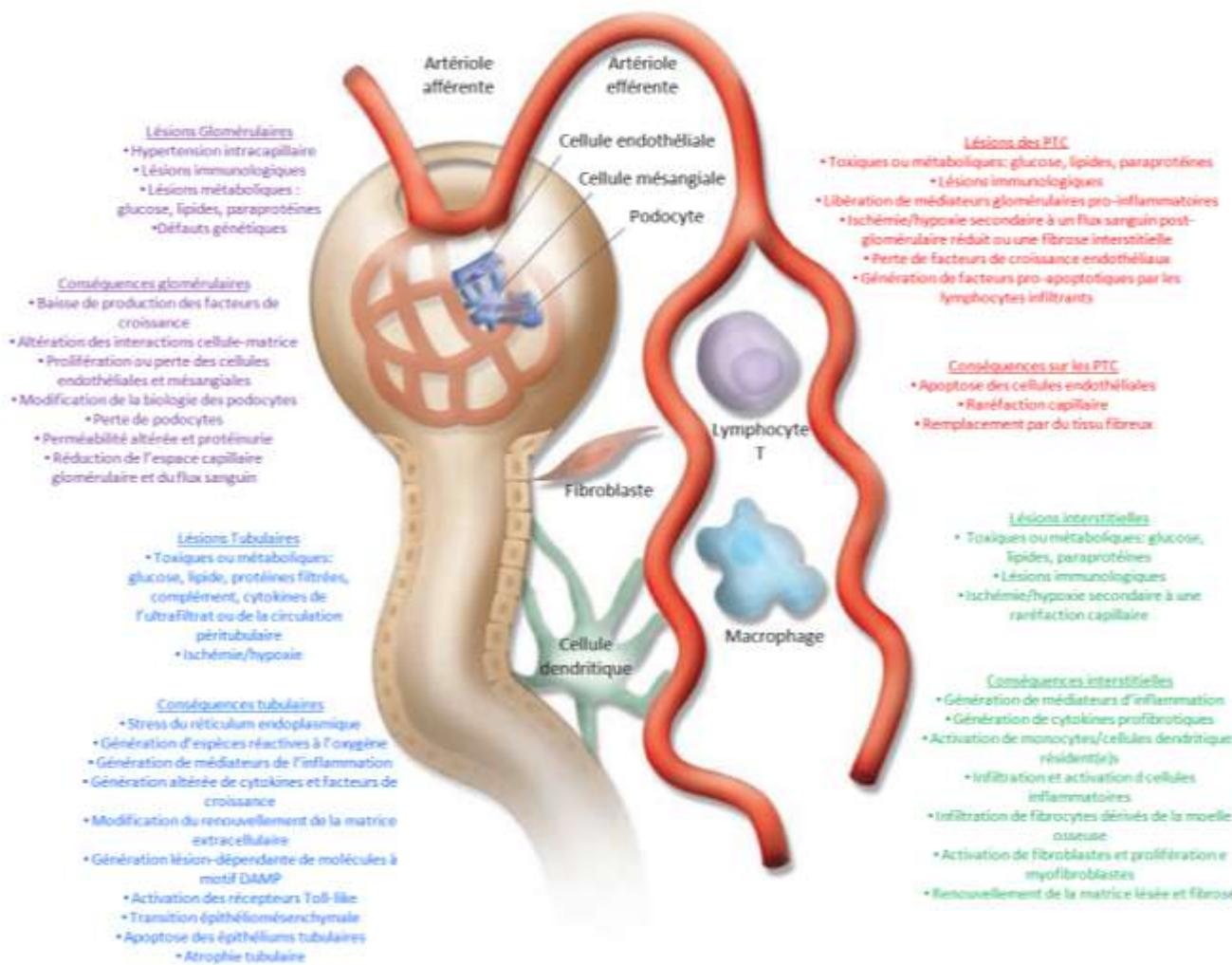


Figure 10: synthèse des facteurs contribuant à la progression des pathologies rénales (Schlondorff 2008)

Les pathologies rénales sont la conséquence d'atteintes pouvant intervenir à plusieurs niveaux. Ainsi les lésions glomérulaires conduisent à une altération des cellules mésangiales et podocytaire, de la protéinurie et une réduction du flux sanguin. Les lésions tubulaires induisent un stress cellulaire, de l'apoptose, une transition épithéliomésenchymateuse et de l'atrophie tubulaire. Les lésions des capillaires péri-tubulaires déclenchent également un phénomène d'apoptose et de fibrose. Enfin, les lésions interstitielles conduisent à de l'inflammation et de la fibrose.

## **II- Les biomarqueurs en transplantation rénale**

Les biopsies protocolaires offrent la possibilité de détecter de façon très précoce des signes infracliniques prédictifs du devenir du greffon. Toutefois elles représentent un geste invasif pour le patient, et comportent un risque pour le greffon, même s'il reste faible. C'est pourquoi l'intérêt des chercheurs et cliniciens se tourne de plus en plus vers la recherche de biomarqueurs urinaires ou sanguins, moins invasifs mais aussi informatifs que les biopsies systématiques et pouvant être répétés dans un suivi de routine. Un biomarqueur peut se mesurer et s'évaluer de manière objective, ce qui constitue par conséquent un indicateur des processus biologiques normaux, des processus pathologiques ou des réponses pharmacologiques à une intervention thérapeutique. Il s'agit donc d'un outil qui peut distinguer un état biologique normal d'un état anormal. En clinique comme en recherche, les biomarqueurs peuvent être de plusieurs sortes, par exemple une protéine, un anticorps, un profil d'expression protéique etc... Les techniques de recherche de biomarqueurs sont également multiples et peuvent être réalisées sur des échantillons sanguins, des urines ou des tissus pour n'en citer que quelques-uns. La recherche de biomarqueurs se déroule alors suivant trois étapes. La première est l'étape d'identification des biomarqueurs, au cours de laquelle tous les résultats correspondant aux critères de positivités sont inclus dans le groupe des biomarqueurs potentiels. La seconde étape consiste à choisir parmi cet ensemble de résultats un sous-groupe de biomarqueurs, les biomarqueurs qui semblent les plus intéressants et qui seront alors analysés plus en détail. Le choix se fait suivant plusieurs critères, dont la disponibilité des réactifs nécessaires à leur étude, et les liens possibles entre le biomarqueur potentiel et la pathologie. Les validations des résultats préliminaires constituent la troisième étape (Gao et al. 2005).

### **1- La recherche de biomarqueurs urinaires**

Les urines sont des échantillons biologiques faciles à obtenir en quantité non limitée. Elles sont déjà utilisées dans le suivi régulier des patients greffés, notamment pour la détection d'une protéinurie. C'est pourquoi leur utilisation dans la recherche de biomarqueurs est naturelle. Trois études ont recherché des biomarqueurs urinaires spécifiques d'atteintes chroniques du greffon (Quintana et al. 2009). L'équipe de Quintana a analysé des profils protéiques urinaire de patients présentant une FIAT ou une AMR, en utilisant la spectrométrie de masse. 14 pics discriminant les deux groupes de patients ont été obtenus, cependant les protéines n'ont pas été identifiées (Quintana et al. 2009). Cette équipe a

réalisé une seconde étude, basée sur l'utilisation d'une électrophorèse 2D-DIGE (2D Differential Gel Electrophoresis) séparant les protéines, puis d'une spectrométrie de masse pour l'identification des cibles. Ils ont ainsi mis en évidence onze protéines présentes dans les urines des patients souffrant d'une dysfonction chronique du greffon (Bañón-Maneus et al. 2010). Certaines de ces protéines avaient cependant déjà été observées dans d'autres pathologies et n'étaient donc pas spécifique de la dysfonction rénale. La troisième étude a combiné les techniques de surface enhanced laser desorption and ionization (SELDI), de chromatographie et de spectrométrie de masse pour obtenir des marqueurs de Néphropathie Chronique du Greffon. Ils ont ainsi identifié l'alpha-1 et la bêta-2 microglobuline, la préalbumine, l'endorepelline et le fragment C terminal antiangiogénique du perlecan (O'Riordan et al. 2007).

## **2- Génomique et biomarqueurs**

Les techniques de spectrométrie de masse et d'électrophorèse offrent une base intéressante de recherche de protéines, toutefois elles sont longues à réaliser et nécessitent de grandes quantités de matériel. Les puces génomiques s'affranchissent de ces problèmes. Elles consomment peu d'échantillon et permettent de tester plusieurs milliers de gènes en une seule expérience.

De très nombreux travaux ont été réalisés en génomique, la liste suivante n'est pas exhaustive. L'étude du génome des patients transplantés a permis d'identifier les gènes activés, et de ce fait les processus mis en jeu, dans différents types de rejet de greffe ou à différents stades post-transplantation. Il a par exemple été montré que les différences transcriptionnelles significatives entre le rejet infraclinique et les deux états de greffon stable et de rein naïf portent sur des cytokines pro-inflammatoires telles que le TNF- $\alpha$ , des transcrits lymphocytaires, à savoir le CD3 et le CD25, des molécules impliquées dans la réponse de type Th1, l'interféron gamma, T-bet, RANTES, ainsi que des molécules inductibles de costimulation, notamment le CD80, le CD154 et ICOS. Le rejet infraclinique se différencie du rejet clinique cellulaire par l'expression différentielle des gènes des deux effecteurs de la voie Th1 Fas Ligand et T-bet, et par le CD152 (Hoffmann et al. 2005). Les transcrits associés aux cellules endothéliales quant à eux sont spécifiques de l'ABMR, même en l'absence de C4d, et corrèlent avec la présence d'anticorps anti-HLA de classe II (Banu Sis et al. 2009). Tribbles-1 est également un biomarqueur spécifique de l'ABMR (Ashton-Chess et al. 2008). De plus, l'analyse séquentielle du transcriptome de patients transplantés rénaux a mis en

évidence un pic de surexpression très précoce des gènes impliqués dans les réponses immunes, dès le premier mois suivant la greffe. Les patients présentent ensuite une surexpression des gènes pro-fibrotiques vers 3 mois, puis des gènes impliqués dans les mécanismes de prolifération et de réparation cellulaire entre 3 et douze mois, et enfin des gènes spécifiques des macrophages sont surexprimés après un an (Vitalone et al. 2010).

Une étude par puces génomique a montré que les greffons provenant de donneurs décédés présentent une surexpression significative des gènes du composant C3 de la voie du complément ainsi que des chimiokines inflammatoires CXCL1 et CXCL2 par rapport aux greffons provenant de donneurs vivants, ce qui est consistant avec des atteintes d'ischémie-reperfusion plus prononcées chez les donneurs décédés. Toutefois sur les 95 gènes étudiés, seule la surexpression du transcrit de l'intégrine  $\beta 2$  a été trouvée prédictive d'une dysfonction rénale et d'une glomérulopathie du transplant à un an (Cravedi et al. 2010).

### **3- Protéomique et biomarqueurs**

La technique des puces à protéines est une technique de criblage à haut débit, tout comme la génomique, mais dont le but est la recherche d'interactions de type protéine-protéine ou antigène-anticorps. Cette technique consiste à incuber une puce sur laquelle sont fixés des antigènes avec des échantillons biologiques, principalement du plasma, du sérum, le plus souvent afin de détecter des anticorps dirigés contre certains antigènes.

Les puces à protéines ont surtout été utilisées en oncologie (Babel et al. 2009) et dans les maladies autoimmunes (Auger et al. 2009), (Li et al. 2005), (Papp et al. 2008) et commencent tout juste à être utilisées dans la recherche de biomarqueurs en transplantation rénale.

La comparaison des sérums en pré-transplantation et des sérums au rejet chez des patients pédiatriques a notamment mis en évidence des anticorps néoformés contre 229 protéines, dont 36 sont reconnues par plus d'un patient. Parmi ces protéines candidates, la PKC $\zeta$  a obtenu le signal le plus élevé et joue un rôle dans la voie de transduction des signaux d'inflammation, elle représente donc un biomarqueur potentiel intéressant (Sutherland et al. 2009). Il reste cependant à déterminer si cet antigène participe activement au processus de rejet de greffe ou s'il n'est que la conséquence d'une dégradation du greffon (Goebel 2009).

Lors de la découverte de la cyclosporine comme traitement immunosuppresseur en 1983, les critères choisis afin d'évaluer son efficacité par rapport à l'azathioprine étaient la survie du greffon et du patient. Par la suite, les critères ont évolué pour prendre en compte la

survenue de rejets aigus, puis l'apparition de lésions histologiques chroniques (Burckart et al. 2008). Les progrès en génomique et protéomique ont abouti à l'identification de nombreuses protéines et molécules prédictives du statu futur du greffon. Il est aujourd'hui nécessaire d'établir une liste des biomarqueurs validés qui pourraient être utilisés dans le but d'évaluer l'impact des nouvelles molécules thérapeutiques en développement sur le greffon rénal.

## **Projet de Recherche**

La transplantation est la solution thérapeutique de choix lorsque le rein cesse de fonctionner. Malgré les progrès réalisés dans le domaine des traitements immunosuppresseurs et une diminution significative de perte précoce du transplant, la survie du greffon à long terme n'augmente pas. En effet, la survie à 10 ans ne dépasse pas les cinquante pour cent. Les lésions conduisant au rejet chronique rénal sont multiples et ont été regroupées en plusieurs catégories selon un schéma de référence, la classification de Banff. Cette classification n'a cessé d'évoluer depuis 1991 grâce aux apports réguliers de la littérature scientifique des congrès internationaux s'intéressant à la transplantation rénale.

Le rejet chronique peut avoir une origine immunologique humorale et est alors appelé rejet chronique humorale actif, ou être la conséquence de lésions chroniques non humorales qui sont regroupées sous le terme de Fibrose Interstitielle et Atrophie Tubulaire (FIAT). La Glomérulopathie du Transplant (GT) est une lésion de rejet chronique humorale actif définie par un dédoublement de la membrane basale glomérulaire, qui peut être accompagné de multilamellation des capillaires péri-tubulaires, d'un épaissement intimal fibreux des artères, de FIAT, et qui doit obligatoirement (selon la dernière classification de Banff) être associé à la présence d'anticorps anti-HLA donneur-spécifiques et à la présence de C4d.

Il est admis que la présence d'anticorps donneur-spécifiques avant la greffe est un facteur de risque pour le greffon. De plus, le développement de novo d'anticorps donneur-spécifiques dirigés contre les molécules HLA de classe II est associé à la Glomérulopathie du Transplant. Cependant les anticorps n'ont pas tous la capacité d'activer le complément et l'influence de ce facteur sur le devenir du greffon est une question qui reste controversée. Le suivi régulier des patients transplantés comprend une détection des immunoglobulines G (IgG) anti-HLA donneur-spécifiques (DSA). Or la classe des IgG est composée de 4 isotypes nommés IgG1, IgG2, IgG3 et IgG4 dont l'IgG1 est l'isotype le plus représenté dans le sérum et l'IgG4 est le plus faible. Parmi ces quatre isotypes, l'IgG1 et l'IgG3 ont la capacité d'activer le complément tandis que les IgG2 et IgG4 ne l'activent pas. Les anticorps activateurs du complément sont alors potentiellement plus délétères que les anticorps n'activant pas le complément, ce qui pourrait également expliquer pourquoi seule la moitié des patients développant une GT présente des dépôts de C4d. D'autre part, tout patient développant une GT développe également des anticorps anti-HLA, en revanche le corollaire n'est pas vrai. Tout patient développant des anticorps anti-HLA DSA ne développe pas obligatoirement de GT.

La présence d'anticorps n'étant pas suffisante, le diagnostic final de la GT et de la FIAT est basé sur une biopsie du greffon. Toutefois la biopsie représente un examen invasif,

difficilement répété à cause des risques engendrés pour le greffon. De plus, l'analyse histologique montre des lésions du greffon et intervient de ce fait tardivement dans le processus de rejet. Il est donc nécessaire de trouver des biomarqueurs pouvant identifier de manière spécifique le type de rejet en cours.

Mon travail de thèse a porté sur deux axes :

- 1- Identifier les isotypes d'anticorps anti-HLA DSA chez des patients transplantés rénaux dans le but de voir si des patients développant une TG possèdent un ensemble d'IgG dominé par des anticorps activant le complément, comparativement à des patients développant des lésions histologiques de FIAT. Pour cela nous avons utilisé la technologie Luminex, utilisée en routine dans les laboratoires d'histocompatibilités, que nous avons modifiée afin de pouvoir détecter séparément les 4 isotypes d'IgG dans le sérum des patients.
- 2- Rechercher des biomarqueurs de différents statuts du transplant rénal par la technique novatrice des puces à protéines. Nous avons dans un premier temps analysé par des techniques biochimiques d'électrophorèse bi-dimensionnelle suivie de western blot, les autoanticorps développés en post-greffe par les patients du groupe GT, dirigés contre des protéines rénales. Puis nous avons cherché à savoir si les panels d'anticorps des deux groupes de patients GT et FIAT sont identiques, se recoupent ou diffèrent totalement d'un type de rejet à l'autre, pouvant alors constituer des biomarqueurs spécifiques des deux lésions. Les sérums des patients du groupe GT, du groupe FIAT et de deux groupes contrôles (patients transplantés stables et patients dialysés en attente de greffe) ont été testés sur des puces contenant plus de 8000 protéines humaines. Les résultats que nous avons obtenus ont permis d'établir des biomarqueurs différents selon le type de rejet chronique étudié. Ces résultats ont fait l'objet d'un dépôt de brevet et seront validés sur un plus grande cohorte de patients.

## Résultats

## **Manuscrit #1: Development of anti-HLA class II donor-specific antibodies after kidney transplantation: is determination of IgG subtypes useful in the management of kidney transplantation?**

La Glomérulopathie du Transplant (GT) et la Fibrose Interstitielle et Atrophie Tubulaire (FIAT) sont deux lésions chroniques associées à une baisse de survie du greffon. Les caractéristiques principales de la GT sont un dédoublement de la membrane basale glomérulaire, des dépôts de C4d et la présence d'anticorps circulants anti-HLA donneur-spécifiques (DSA). Ces deux dernières caractéristiques sont les signes d'une activité humorale du receveur dirigée contre le greffon. La FIAT désigne une atteinte non immunologique du transplant, telles qu'une toxicité des inhibiteurs de la calcineurine, une infection virale ou bactérienne. Le diagnostic de ces deux atteintes chroniques est basé sur une biopsie du transplant, qui est un geste invasif et présente des lésions visibles sur le greffon. Le suivi de l'apparition et de l'évolution des anticorps anti-HLA donneur-spécifiques à partir d'un échantillon de sang est un moyen non invasif de détecter et suivre une GT. Les deux techniques principalement utilisées sont l'Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) et une détection en phase liquide utilisant des billes sur lesquelles sont fixés les antigènes HLA. Ces techniques permettent, suivant le degré de précision désiré, de détecter l'apparition d'anticorps dirigés contre les molécules HLA de classe I ou de classe II, de calculer un degré d'immunisation par Panel Reactive Antibody (PRA) et d'identifier au niveau allélique les antigènes reconnus par les anticorps du patient. Le suivi régulier des patients consiste en une détection des immunoglobulines G (IgG). Toutefois, les IgG comprennent quatre sous-types, dont deux (IgG1 et IgG3) sont capables de fixer et d'activer le complément, induisant ainsi les dépôts de C4d caractéristiques de la GT, et deux sous-types (IgG2 et IgG4) ne fixent pas le complément.

Nous nous sommes donc intéressés aux sous-types d'anticorps anti-HLA DSA développés par des patients transplantés. Notre hypothèse était que les patients développant des anticorps majoritairement de type activateurs du complément présenteraient des formes de rejet plus sévères que les patients développant principalement des anticorps non-activateurs du complément. Afin de vérifier notre hypothèse, nous avons sélectionné 20 patients ayant développé des DSA anti-HLA post-greffe. Parmi ces 20 patients, 10 présentaient une GT confirmée par biopsie, 8 ne présentaient que des signes histologiques de FIAT, ces patients étant alors probablement à un stade d'AMR plus précoce que les patients GT. Enfin, 2 patients n'ont pas eu de biopsie car ils ne présentaient aucun signe clinique de rejet. Nous

avons analysé les sérums par un test de Single Antigen Bead Assay afin de détecter les variant alléliques reconnus, en utilisant la technologie Luminex. Nous avons remplacé l'anticorps secondaire anti-IgG par des anticorps spécifiques de chaque sous-type d'IgG.

Cette étude a apporté plusieurs observations intéressantes. Aucun profil d'isotype d'IgG ne corrèle avec les différents types de lésions histologiques observées chez les patients. Aucune différence significative n'est observée entre les patients GT et les patients FIAT concernant la fréquence des différentes sous-classes d'IgG, ou les intensités de fluorescence engendrées par la reconnaissance des antigènes HLA par les anticorps quelle que soit la sous-classe analysée. Cependant, les patients GT reconnaissent un nombre significativement plus élevé d'antigènes HLA donneur-spécifiques que les patients FIAT. Contrairement à notre hypothèse de départ, les sous-classes d'IgG n'activant pas le complément, et notamment l'IgG4, ne sont pas moins délétères que l'IgG1. En effet, de forts taux d'IgG4 n'ont été détectés que chez très peu de patients, ayant tous développé une GT. Enfin, nous avons observé que la présence de forts taux d'IgG1 reconnaissant peu d'antigènes n'est pas prédictive d'une baisse de survie du greffon lorsqu'elle est la seule sous-classe présente.

Manuscrit en préparation

## **Development of anti-HLA class II donor-specific antibodies after kidney transplantation: is determination of IgG subtypes useful in the management of kidney transplantation?**

Sandrine Le Roux<sup>1</sup>, Bernard Vanhove<sup>1</sup>, Anne Devys<sup>2</sup>, Anne Cesbron<sup>2</sup>, Maryvonne Hourmant<sup>1, 3</sup> and Jean Harb<sup>1, 3\*</sup>

1: INSERM U643, University and CHU of Nantes, Immeuble Jean Monnet, Hôtel Dieu. 30 boulevard Jean Monnet, 44093 Nantes Cedex France

2 : Laboratoire d’Histocompatibilité, EFS de Nantes, 32 Boulevard Jean Monnet, 44093 Nantes Cedex France

3 : Both authors contributed equally

\* :Corresponding author : Jean Harb : Inserm UMR 643, CHU Hôtel Dieu, 30 Boulevard Jean Monnet, 44093 Nantes Cedex 01 France; tel: +33240087411 ; e-mail : [jean.harb@univ-nantes.fr](mailto:jean.harb@univ-nantes.fr)

Funding sources : this study was supported by a grant of the joint INSERM and DHOS translational research program.

Abbreviations: TG: Transplant Glomerulopathy; IFTA: Interstitial Fibrosis and Tubular Atrophy; HLA: Human Leukocyte Antigen; DSA: Donor Specific Antibody

## Abstract

**BACKGROUND:** Chronic Active Antibody-Mediated Rejection is defined by the presence of C4d on the graft, morphologic evidence of chronic tissue injury and circulating anti-HLA antibodies. Anti-HLA class II are often associated with chronic rejection whereas anti-HLA class I are associated with acute rejection. The occurrence of Donor Specific Antibody (DSA) *versus* Non DSA (NDSA) pre- or post-transplantation and its correlation with kidney graft failure have widely been studied. But the impact of complement activating or non-complement activating antibodies on the graft outcome is still controversial. Indeed, IgG1 and IgG3 strongly fix and activate the complement whereas IgG2 and IgG4 do not. **AIM:** The aim of our study was to retrospectively investigate whether the IgG DSA of different subtypes developed by patients after transplantation have an influence on the kidney graft chronic lesions. **METHODS:** 20 patients, with known post-transplant anti-HLA class II DSA, were screened by Single Antigen Assay with Luminex Technology. The first HLA positive serum was studied for each patient. We used mouse anti-human IgG1, IgG2, IgG3 and IgG4 to detect patient anti-HLA IgG subtypes. **RESULTS:** Several observations have been made: (I) Antibody subtype profiles do not significantly correlate with TG or IFTA lesions; (II) The presence of IgG1 DSA alone is not predictive of graft failure, since 2 of the patients showed good kidney graft function despite the presence of IgG1 DSA; (III) The number of antigens targeted by patients complement activating DSA is significantly more elevated in TG patients compare to IFTA patients ( $8.2 \text{ vs } 3.6, p=0.0448$ ); (IV) Although IgG4 is not a good complement activator, even at high levels, the presence of IgG4 DSA is not associated with attenuated lesions than IgG1. **Conclusion:** IgG subtype profiles do not seem to correlate with kidney graft histological lesions.

## Introduction

Although huge improvements have been made in the field of solid organ transplantation, chronic rejection remains a major problem, with approximately 40% of kidney lost at ten years post-transplantation (1). The two leading causes of late graft failure are the antibody-mediated rejection which is an alloimmune injury, and the Interstitial Fibrosis and Tubular Atrophy, which is a non immune injury.

As soon as 1969, anti-HLA antibodies have been suspected to be involved in graft failure (2). It is now well established that their presence prior to transplantation (3) as well as post-transplantation (4) is a risk factor for the transplant outcome. Anti-HLA class I antibodies developed *de novo* are associated with acute rejection (4) whereas anti-HLA class II antibodies correlate with late graft lesions and TG (5). The recent development of bead-based (Luminex) solid phase assay allows a fast, sensitive and regular detection and follow-up of patient donor-specific antibodies. However, there is increasing evidence that DSA do not inevitably cause graft injury and presensitized patients present good kidney graft function after plasmapheresis despite low levels of anti-HLA DSA (6). One possible explanation for this phenomenon is the level of circulating antibodies, with high levels leading to graft injury while low levels would not. But the antibody subtype could also be taken into account.

Indeed, the regular patient follow-up includes monitoring of his antibodies against donor-specific HLA. Only total IgG are checked, but this class contains four subclasses, namely IgG1, IgG2, IgG3 and IgG4 with different attributes (7). IgG1 is the most common subtype found in normal human serum and is able to bind and activate the complement pathway. IgG3 is also a good complement activator, unlike IgG2 and IgG4 which are non complement activator antibodies (8). These complement activation abilities might play a role in the severity of graft injury.

Complement activator and non-complement activator antibodies have mainly been analyzed in pre-transplant serum of immunized patients awaiting a new renal transplantation. It has been shown that 40% of immunized patients have antibodies of the non complement activator IgG2 and IgG4 subtypes and most of them are donor-specific (9). Those two subtypes are also found in 28% of antibodies eluted from rejected kidney transplants (10). But their impact in graft outcome is unclear. However, complement activating antibodies,

and particularly IgG1, in pretransplant serum correlates with a decreased kidney graft survival (11).

As IgG2 and IgG4 are non complement activators, their presence in serum could compete for HLA class II targets and thus attenuate the immune chronic response. The difference in IgG subtype profil could help predicting the transplant outcome and be a parameter to take into consideration in the management and treatment of patient.

## Materials and methods

### Patient selection

Twenty recipients of a kidney transplant with donor-specific antibodies against HLA class II antigens were selected for the study. Patients were selected at 2 institutions (University Hospital of Angers and Nantes). The twenty selected patients were six females and fourteen males transplanted between 1991 and 2008. Three patients had anti-HLA class I donor-specific antibodies at the same time.

### Sample collection

Transplanted patients have routinely collected serum samples available at the Histocompatibility Laboratory at the Etablissement Français du Sang. We initially used 3-4 sera per patient. As antibodies MFI did not show great variations between the 3 or 4 sera tested for patients, we performed the analysis on the first serum of each patient. Donor-specificity of anti-HLA class II antibodies was assessed by high definition Single Antigen Bead Assay (Labscreen™ Single Antigen, INGEN, Chilly-Mazarin, FRANCE) using Luminex technology.

### Solid phase bead-based assay

The sera were screened on modified Single Antigen Bead Assay using Luminex technology. Briefly, 4 $\mu$ l of single antigen HLA class II beads were incubated with 16 $\mu$ l of serum for 30 minutes in the dark under gentle shaking. The plates were then washed three times and incubated with phycoerythrin conjugated secondary antibody specific of one of the four IgG subtypes for 30 minutes in the dark under gentle shaking. The secondary antibodies were mouse anti-human IgG1, mouse anti-human IgG2, mouse anti-human IgG3 and mouse anti-human IgG4 antibodies purchased from SouthernBiotech (SouthernBiotech, Birmingham, AL, Canada). Luminex technology allows to detect both antibody bound to the bead, and bead antigen identification. A negative serum was also run in each experiment as a negative control, and the background signal obtain for each bead was subtracted to the samples results. A background subtracted signal above 3 times the negative control signal was

considered positive. That threshold was calculated for each bead. The positive threshold was thus fixed at 100 MFI.

### **Statistical analysis**

Several DSA beads were obtained for each patient so all DSA Mean Fluorescence Intensity (MFI) values were added up for a given patient in order to obtain a unique DSA response for that patient. A nonparametric Mann-Whitney test was then applied to compare mean DSA MFI values between groups of patients.

## Results

### **Patients characteristics**

Twenty patients were included in this study (table 1). Ten patients had biopsy-proven Transplant Glomerulopathy (TG) according to the 2005 Banff classification, among whom 8 were C4d<sup>+</sup>, 8 patients had biopsy-proven Interstitial Fibrosis and Tubular Atrophy (IFTA) lesions, all C4d<sup>-</sup>. Two patients had good kidney graft function and have not been biopsied. Patients were transplanted between 1991 and 2008 and developed anti-HLA DSA between 1 and 12 (mean 3.8±1.25) years post-transplantation in TG group, and between 2 months and 8 years (mean 2.5±0.96) in IFTA group.

### **Antibody subtype profiles do not significantly correlate with histologic lesions.**

Patients sera were screened on single antigen beads to assess the profiles of the four IgG subtypes antibodies. Each patient is represented on the graph by a single value which stands for the sum of all DSA values of that patient for the subtype. IgG1 was the most widely developed antibody (figure 1A) present in all 10 (100%) TG patients and in 7 (87.5%) IFTA patients. The average total IgG1 response among TG patients was 14560 vs 7911 in IFTA group (ns). IgG2 was the second more represented subtype, developed by 10 (100%) TG patients and 5 (62.5%) IFTA patients with mean values of 4183 vs 1440 respectively (ns) (figure 1B). IgG3 was present in 9 (90%) TG patients and 7 (87.5%) IFTA patients, both developing similar mean values (17781 vs 16031, ns) (figure 1C). IgG4 was less frequently developed by patients of both groups (figure 1D), only four (40%) TG patients and 1 (12.5%) IFTA patient. The mean values were 8562 and 14.88 for TG and IFTA patients respectively (ns). None of the subtypes significantly differ from TG and IFTA groups.

### **The number of antigens targeted by patients DSA is significantly higher in TG patients**

The number of targeted antigens by TG and IFTA patients DSA was evaluated. Both IgG1 and IgG3 can fix and activate the complement, so both IgG1 and IgG3 targeted beads were taken into account. When considering strongly positive recognition (MFI>1000), complement activating antibodies (IgG1 plus IgG3 subtypes) targeted an average of 8.2 beads in the TG

patients vs 3.6 beads in the IFTA group ( $p=0.0448$ ) (figure 2). The number of targets recognized by DSA is thus significantly different among the two groups of patients.

### **High IgG4 levels can be associated with TG whatever the MFI**

Among the twenty patients, only two developed high levels of IgG4. TG1 patient developed antibodies of the four subtypes, with a highly IgG4 predominance, against 8 beads of the DQ7 and DQ9 antigens (figure 3A). For TG1, IgG1 MFI values were between 649 and 1986, IgG2 MFI values were between 277 and 3486, IgG3 MFI values were between 117 and 136 and finally IgG4 MFI values were between 7154 and 9804. The non complement activating antibodies level, comprising IgG2 and IgG4 DSA, has an average MFI value of 4936 (277-9804) whereas the complement activating antibodies level, comprising IgG1 and IgG3 DSA, has a significantly different average MFI value of 847 (117-1986) ( $p=0.002$ ). So the ratio between non complement-activating antibodies (IgG2+IgG4) and complement-activating antibodies (IgG1+IgG3) is 6,66 for this patient. The non complement-activating antibody level does not reach significant difference for TG2 patient despite a positive (IgG2+IgG4)/(IgG1+IgG3) ratio of 1,05. IgG4 dominance was not obvious but still reached high levels of MFI values ranging from 588 to 4562 against the five DQ2 beads (figure 3B). IgG1 MFI values were between 3070 and 3734, IgG2 MFI values were between 613 and 2522 and IgG3 MFI values were between 142 and 614. So it seems that high levels of IgG4 is not correlated with attenuated graft injury as those two patients developed Transplant Glomerulopathy.

### **DSA antibodies of IgG1 subtype alone is not predictive of graft failure**

Sera of two transplanted patients with good kidney function (GKF1 and GKF2, figure 4C) were screened on the modified Single Antigen assay. Three sera were screened for GKF1 patient, and four for GKF2 patient, to follow the changes in levels of the four IgG subtypes. Both patients have developed donor-specific antibodies against HLA class II antigens and none developed any anti-HLA class I antibody. GKF1 patient first developed anti-HLA DSA twelve years after transplantation. These antibodies were directed against only the two beads wearing DR51 antigen and were of IgG1 ( $MFI > 3600$ ) and IgG2 ( $MFI > 1100$ ) subtype (figure 4A). IgG2 subtype later disappeared and IgG1 antibodies reached higher MFI values then decreased almost until basal level in the two following samples. GKF2 patient first

showed DSA 6 years post-transplantation (figure 4B). He developed IgG1 against all five DQ2 beads and DR18 bead with two beads showing high MFI values (above 1000) and four beads with MFI values between 171 and 369 (above the threshold). One bead has also been recognized by IgG2 and IgG3 antibodies (1072 and 188 MFI) but those subtypes disappeared in the following samples. The same bead was still recognized by IgG1 antibodies in the three last samples with a small decrease in MFI values, which fell to 1611 ten years post-transplantation. This could suggest that a positive IgG1 DSA response, when directed against few beads with no or low levels of other subtypes, is not predictive of graft failure.

## Discussion

Transplantation is the treatment of choice for end stage renal disease. However, despite great improvements in immunosuppression, around forty per cent of the grafts are still lost within ten years. The presence of anti-HLA significantly correlates with lower graft survival, decline in kidney graft function and proteinuria (12). An increasing number of studies have demonstrated that anti-HLA class II antibodies are associated with chronic rejection.

The development of new solid phase screening methods, such as Enzyme Linked Immunosorbent Assay, then bead-based assay, allows the detection of both complement and non complement activating antibodies. These techniques only detect anti-HLA antibodies, unlike CDC assay, but are more precise, as the single antigen assay shows which HLA allele is recognized by antibodies. It allows identification of both donor-specific and non-donor-specific antibodies.

Transplant Glomerulopathy is a chronic active antibody-mediated rejection, mostly characterized by circulating donor-specific anti-HLA antibodies and C4d deposits (13). IgG1 and IgG3 are two IgG subtypes able to fix and activate the complement, whereas IgG2 and IgG4 are non-complement activators. C4d deposits are thus probably due to IgG1 or IgG3 and not to IgG2 and IgG4. IFTA is on the contrary defined as a non immune injury. Surprisingly, eight of the patients studied, despite the presence of anti-HLA DSA, showed histological lesions of IFTA only. As DSA are associated with chronic rejection, it is possible that these patients are at an early stage of AMR and will evolve into TG lesions. Our data demonstrated that IFTA patients developed strongly positive IgG1, IgG2 and IgG3 antibodies. Furthermore, despite the presence of strong complement-activating antibodies response, IFTA biopsies showed no detectable C4d split products. It has been showed that only 50% of Transplant Glomerulopathy biopsies presented C4d split products (14), so whatever the cause of this lack of complement deposition is, it could be the same that occurs for these IFTA patients.

Our study aimed at identifying IgG subtypes profiles in transplanted patients sera and see if it correlates with the histological lesions. No correlation was found between the IgG subtypes and the type of histological lesion observed among the patients. IgG subtypes profiles could not predict graft outcome.

When comparing MFI values of DSA developed by IFTA and TG patients, no difference was found. A close look at the mean values of the two groups shows that MFI values are slightly higher in the TG group than in the IFTA group, for all subtypes, but this difference does not reach statistical significance. IgG1 and IgG3 are the two most frequently developed subtypes, at the highest MFI values, by patients of the two groups. This finding was also observed in pretransplant serum of sensitized patients (15). IgG2 subtype is developed by the entire TG group, but only by half of IFTA patients. IgG4 was the less frequently developed subtype. It was only found in 4 out of ten TG patients and only one IFTA patient.

Our data also show that patients of the TG group, which is an antibody-mediated injury, often associated with C4d deposits (8 out of 10), develop complement activating DSA against a significantly higher number of targets (8.2) than IFTA patients (3.6) when considering strongly positive recognition. No significant difference was observed in the number of beads targeted by non-complement activating antibodies.

As IgG4 does not activate the complement, our hypothesis was that it could compete with IgG1 and IgG3 for HLA targets, leading to an attenuated humoral response. Our data do not confirm that hypothesis. Indeed, only two patients developed high levels of IgG4, with a positive ratio between non-complement activating antibodies and complement activating antibodies, and those two patients had Transplant Glomerulopathy. The patients also developed IgG1 at various levels. This could be sufficient to activate the complement. IgG4 has the particularity to exchange light chains, be functionally bispecific and cross-link two different antigens (7). This particularity decreases the antibody half-life and may prevent IgG4 to provide a better graft outcome.

IgG1 is the most abundant IgG subtype in normal human serum, and is a good complement activator (7). Our results show that IgG1 does not seem to be a good predictor of graft failure. We have detected IgG DSA of almost only IgG1 subtype in the sera of two patients with good kidney function. Despite high levels of antibodies, patients serum creatinine and proteinuria remain stable. Several observations are associated with that situation. First, DSA appeared late in the two patients, 6 and 12 years post-transplantation respectively. That late antibody development may be a sign of extremely slow antibody-mediated humoral response which will never reach sufficient level to lead to graft rejection. In addition, despite the high MFI levels reached by DSA, very few antigens were targeted. This is consistent with our observation that the number of beads recognized by patients significantly differs between TG and IFTA patients. The breadth of DSA development may play a role in the

severity of antibody-mediated injury. It is also possible that these two patients have developed accommodation to their graft.

Our study has limitations. Our cohort of patient is small and only allows observation. A larger cohort is necessary to confirm the results. Furthermore we have chosen a very low positive threshold, at 100 MFI. This low threshold allows us to detect small variations in patient's DSA profile levels. However, the huge sensitivity of Luminex technology is also a limitation, as it detects antibodies that might not be relevant to kidney graft injury and outcome. Being too stringent in the choice of positivity threshold increases the risk of missing important antibodies, but being too lax provides an important panel of antibodies among which some could be too low to be relevant (16). In addition, the two patients with IgG1 only DSA did not have biopsy because they did not show clinical sign of graft dysfunction in the four year follow-up. We thus can not ensure that there is no subclinical lesions on the graft.

## Conclusion

In conclusion, our study provides new observations in the field of anti-HLA Donor Specific Antibodies. No IgG subtypes profiles correlated with the severity of histological lesions observed on the graft. IgG1 antibodies alone, even at high MFI values, does not seem predictive of poor graft outcome, but this was only observed in 2 patients. IgG4 did not correlate with better graft outcome than IgG1 subtype. The only characteristic that we found significantly different between TG and IFTA patients was the number of donor-specific antigens recognized by patients DSA.

## References

1. Rapport d'activité de l'Agence de la biomédecine 2008. .
2. Morris, P. J., M. R. Mickey, D. P. Singal, et P. I. Terasaki. 1969. Serotyping for homotransplantation. XXII. Specificity of cytotoxic antibodies developing after renal transplantation. *Br Med J* 1: 758-759.
3. Rose, M. L., et J. D. Smith. 2009. Clinical relevance of complement-fixing antibodies in cardiac transplantation. *Hum. Immunol* 70: 605-609.
4. Worthington, J. E., S. Martin, D. M. Al-Husseini, P. A. Dyer, et R. W. G. Johnson. 2003. Posttransplantation production of donor HLA-specific antibodies as a predictor of renal transplant outcome. *Transplantation* 75: 1034-1040.
5. Campos, E. F., H. Tedesco-Silva, P. G. Machado, M. Franco, J. O. Medina-Pestana, et M. Gerbase-DeLima. 2006. Post-transplant anti-HLA class II antibodies as risk factor for late kidney allograft failure. *Am. J. Transplant* 6: 2316-2320.
6. Higgins, R., M. Hathaway, D. Lowe, F. Lam, H. Kashi, L. C. Tan, C. Imray, S. Fletcher, D. Zehnder, K. Chen, N. Krishnan, R. Hamer, et D. Briggs. 2007. Blood levels of donor-specific human leukocyte antigen antibodies after renal transplantation: resolution of rejection in the presence of circulating donor-specific antibody. *Transplantation* 84: 876-884.
7. Salfeld, J. G. 2007. Isotype selection in antibody engineering. *Nat. Biotechnol* 25: 1369-1372.
8. Baldwin, W. M., S. K. Pruitt, R. B. Brauer, M. R. Daha, et F. Sanfilippo. 1995. Complement in organ transplantation. Contributions to inflammation, injury, and rejection. *Transplantation* 59: 797-808.
9. Arnold, M., M. Dechant, I. I. N. Doxiadis, et B. M. Spriewald. 2008. Prevalence and specificity of immunoglobulin G and immunoglobulin A non-complement-binding anti-HLA alloantibodies in retransplant candidates. *Tissue Antigens* 72: 60-66.
10. Heinemann, F. M., I. Roth, V. Rebmann, M. Arnold, O. Witzke, B. Wilde, B. M. Spriewald, et H. Grosse-Wilde. 2007. Immunoglobulin isotype-specific characterization of anti-human leukocyte antigen antibodies eluted from explanted renal allografts. *Hum. Immunol* 68: 500-506.
11. Griffiths, E. J., R. E. Nelson, P. J. Dupont, et A. N. Warrens. 2004. Skewing of pretransplant anti-HLA class I antibodies of immunoglobulin G isotype solely toward immunoglobulin G1 subclass is associated with poorer renal allograft survival. *Transplantation* 77: 1771-1773.
12. Hourmant, M., A. Cesbron-Gautier, P. I. Terasaki, K. Mizutani, A. Moreau, A. Meurette, J. Dantal, M. Giral, G. Blancho, D. Cantarovich, G. Karam, G. Follea, J. Soulillou, et J. Bignon. 2005. Frequency and clinical implications of development of donor-specific and non-donor-specific HLA antibodies after kidney transplantation. *J. Am. Soc. Nephrol* 16: 2804-2812.
13. Sis, B., M. Mengel, M. Haas, R. B. Colvin, P. F. Halloran, L. C. Racusen, K. Solez, W. M. Baldwin, E. R. Bracamonte, V. Broecker, F. Cosio, A. J. Demetris, C. Drachenberg, G. Einecke, J. Gloor, D. Glotz, E. Kraus, C. Legendre, H. Liapis, R. B. Mannon, B. J. Nankivell, V. Nickeleit, J. C. Papadimitriou, P. Randhawa, H. Regele, K. Renaudin, E. R. Rodriguez, D. Seron, S. Seshan, M. Suthanthiran, B. A. Wasowska, A. Zachary, et A. Zeevi. 2010. Banff '09 Meeting Report: Antibody Mediated Graft Deterioration and Implementation of Banff Working Groups. *Am J Transplant* .
14. Regele, H., G. A. Böhmig, A. Habicht, D. Gollowitzer, M. Schillinger, S. Rockenschaub, B. Watschinger, D. Kerjaschki, et M. Exner. 2002. Capillary deposition of complement split product C4d in renal allografts is associated with basement membrane injury in peritubular and glomerular capillaries: a contribution of humoral immunity to chronic allograft rejection. *J. Am. Soc. Nephrol* 13: 2371-2380.
15. Bartel, G., M. Wahrmann, M. Exner, H. Regele, M. Schillinger, W. H. Hörl, et G. A.

- Böhmig. 2007. Determinants of the complement-fixing ability of recipient presensitization against HLA antigens. *Transplantation* 83: 727-733.
16. Aubert, V., J. Venetz, G. Pantaleo, et M. Pascual. 2009. Low levels of human leukocyte antigen donor-specific antibodies detected by solid phase assay before transplantation are frequently clinically irrelevant. *Hum. Immunol* 70: 580-583.

## Figure Legends

### Table 1: Patients characteristics

Tx = transplantation

\*This patient developed DSA 2 months after transplantation.

### Figure 1: Antibody subtype profiles and histological lesions.

Patients IgG subtypes DSA were screened on Single Antigen Bead Assay as described under methods. Each point represents the sum of IgG1 DSA MFI values for all the DSA beads. TG (dot) and IFTA (square) patients are indicated for IgG1 (A), IgG2 (B), IgG3 (C) and IgG4 (D) subtypes.

### Figure 2: Comparison of the number of DSA targets between TG and IFTA patients.

Each dot represents the total number of HLA beads recognized by donor-specific antibodies of the complement activating IgG1 and IgG3 subtypes by a TG patient. Only beads above 1000 MFI were considered. Each square represents the total number of HLA beads recognized by donor-specific antibodies of the complement activating IgG1 and IgG3 subtypes by an IFTA patient. The mean recognition is 8,2 beads in TG group *versus* 3,6 beads in IFTA group ( $p=0.04$ ).

### Figure 3: Non-complement activator antibodies dominance in TG patients

Upper graphs show the MFI values of the four subtypes of DSA in TG1 (A) and TG2 (B) patients. The lower graphs compares the complement activating antibodies MFI values (black dots) and non complement activating antibodies MFI values (black squares). Non complement activating antibodies MFI values are significantly more elevated than complement activating antibodies MFI values ( $p=0.002$ ) for TG1 patient (A) but not for TG2 patient (B).

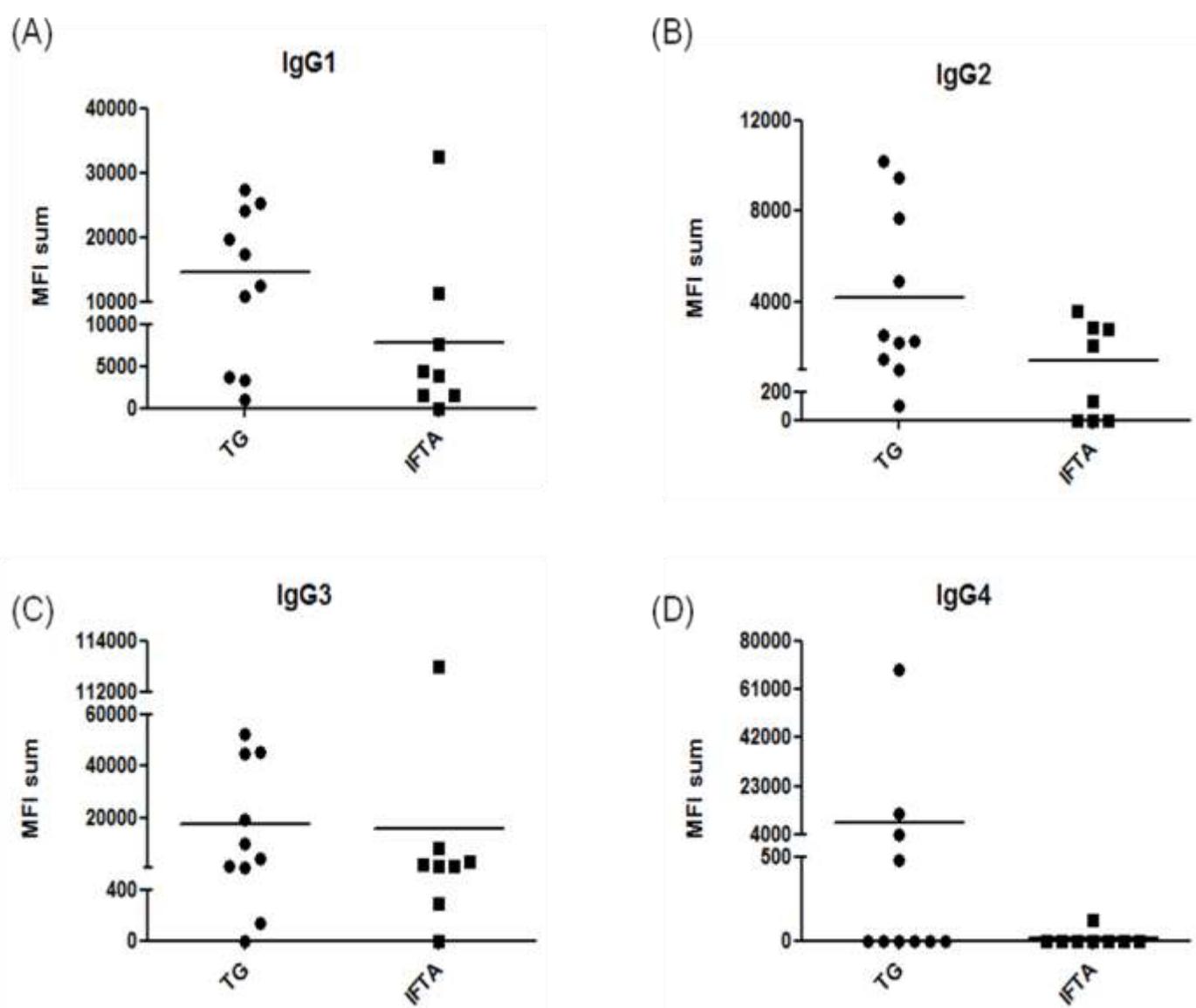
### Figure 4: Donor-specific IgG1 antibodies in patients with good kidney function

IgG1 (square), IgG2 (cross) and IgG3 (triangle) were detected in two good kidney function patients GKF1 (A) and GKF2 (B). Their creatinemia and proteinuria are indicated (C) for every sample tested.

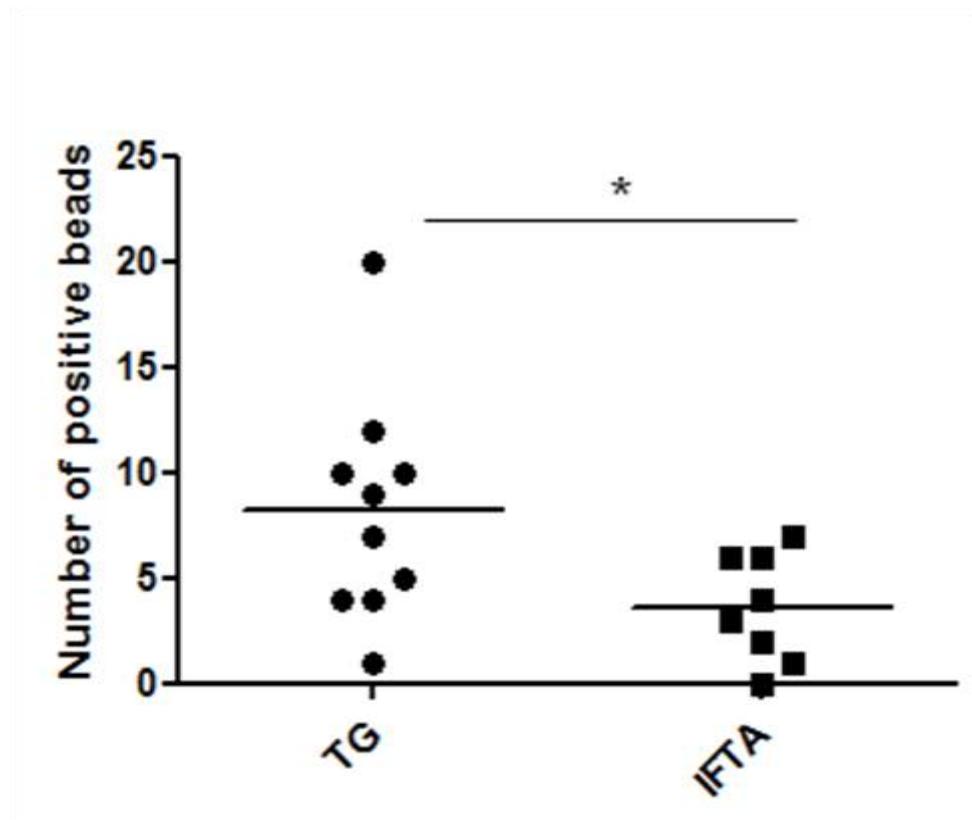
## Table 1

	TG	IFTA	GKF
M/W	7/3	5/3	2/0
Graft (year)	1991-2006	1993-2008	1990-1997
Recipient's age (year)	22-56	30-51	31-61
First DSA (year post-tx)	1-12	0*-8	6-12
Anti-HLA class I DSA	1	0	0
C4d	8/10	0/10	NA

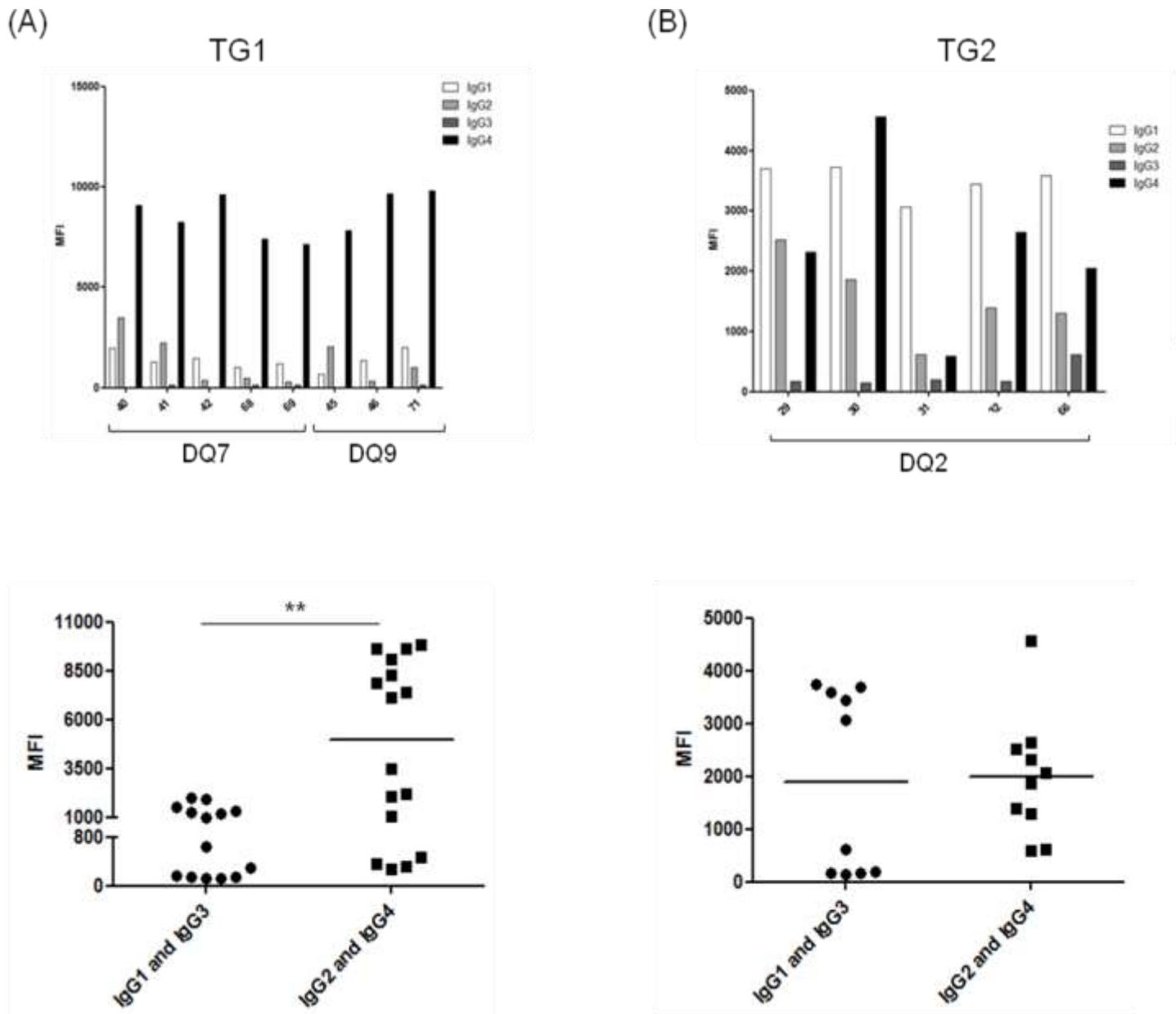
**Figure 1**



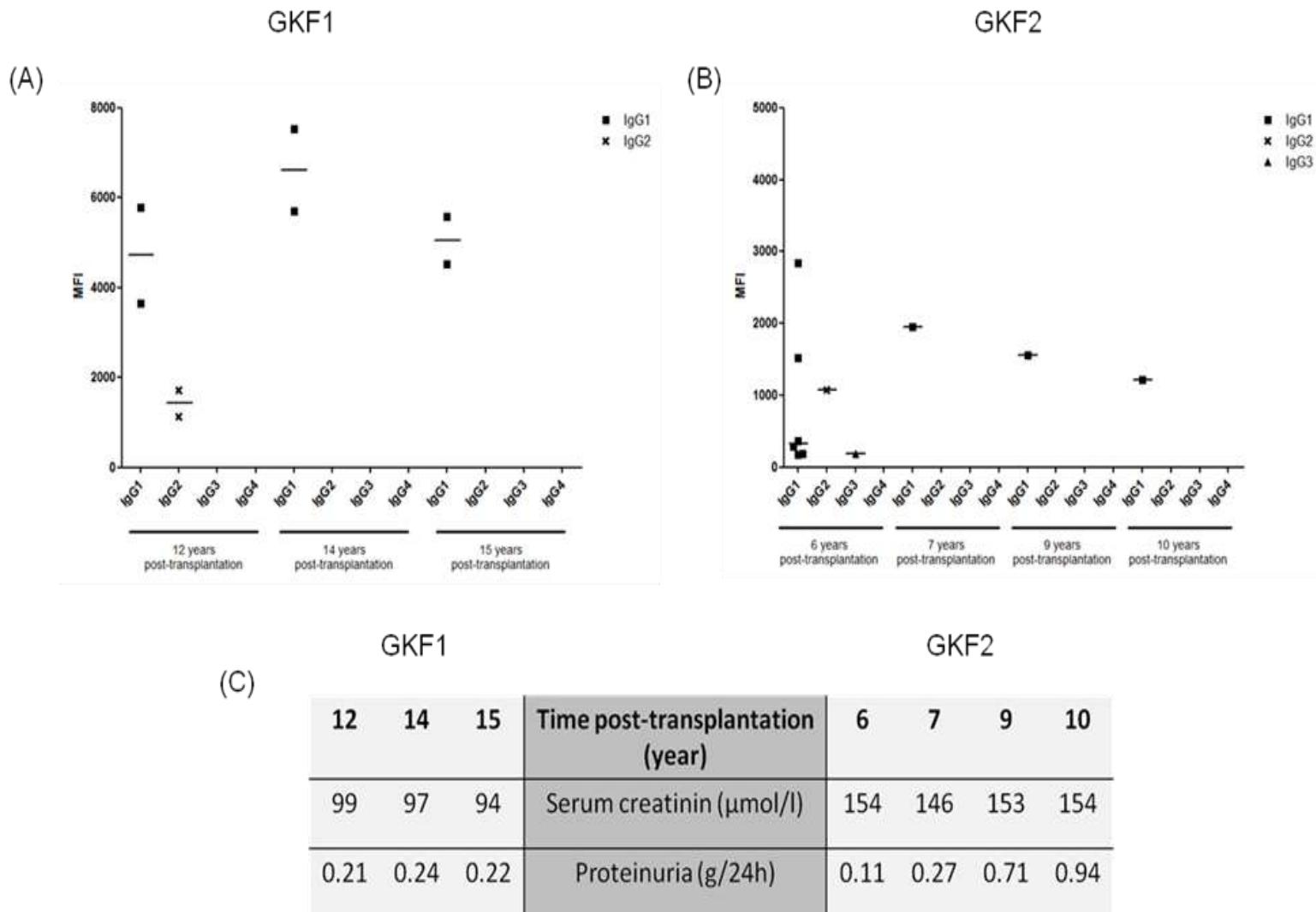
**Figure 2**



**Figure 3**



**Figure 4**



## **Manuscrit #2: Biomarkers for the diagnosis of the stable kidney transplant and chronic transplant injury using the ProtoArray® technology**

Le diagnostic actuel du rejet chronique rénal est basé sur une biopsie du greffon. Plusieurs études ont démontré l'intérêt de pratiquer des biopsies protocolaires sur les patients greffés. Ces biopsies séquentielles ont permis de mettre en évidence des signes infracliniques de TG et de FIAT dès les premiers mois suivant la transplantation. Toutefois les biopsies sont des gestes invasifs qui, même si les risques encourus sont faibles, ne sont pas facilement répétés. Il serait donc intéressant de disposer d'une technique non invasive permettant de détecter précocement des marqueurs prédictifs du devenir du greffon. Il a été montré que les patients transplantés développaient, en plus des DSA anti-HLA, des anticorps dirigés contre des antigènes qui ne sont pas des molécules HLA, notamment des protéoglycans à héparanes sulfates. De plus, des autoanticorps dirigés contre des constituants de la membrane basale glomérulaire ainsi que des anticorps anti-HLA ont été découverts chez des individus sains. Il est donc concevable que tous les individus présentent dans leur sérum des anticorps dirigés contre des structures non-HLA, et que ces anticorps reconnaissent différentes cibles selon l'état de santé de la personne.

Notre étude s'est donc intéressée aux anticorps développés par les patients transplantés. Nous avons émis l'hypothèse que des patients présentant une Glomérulopathie du Transplant (GT), qui est une lésion de rejet chronique humorale actif, développeraient des anticorps dirigés contre des antigènes différents que ceux reconnus par les anticorps de patients présentant une Fibrose Interstitielle et Atrophie Tubulaire. Nous avons sélectionné un groupe de patients présentant une GT confirmée par biopsie ( $n=13$ ), un groupe de patients dont la Fibrose Interstitielle et Atrophie Tubulaire a été confirmée par biopsie ( $n=10$ ) et un groupe de patients Stables, dont la fonction rénale est normale après un an et dont la biopsie systématique ne présente aucune lésion du transplant. Pour chaque patient, un sérum prélevé au moment de la biopsie a été utilisé. Les sérums ont été analysés par la technique des Protoarrays, d'Invitrogen. Ces puces contiennent plus de 8000 protéines humaines et sont incubées avec un sérum de patient, puis les anticorps fixés sont révélés avec une anti-IgG humaine couplée à un fluorochrome, alexa-fluor. Un test M-statistic compare alors les signaux obtenus par les patients de deux groupes et détermine les

protéines dont les signaux sont significativement plus élevés dans un groupe que dans l'autre. En effectuant ces analyses pour comparer chaque groupe à chacun des deux autres, nous avons obtenu des listes de protéines uniques spécifiques de chaque groupe. Parmi ces protéines, nous avons sélectionné 18 biomarqueurs de GT, 11 biomarqueurs de FIAT et 10 biomarqueurs de patients Stables potentiellement impliqués dans les phénomènes de lésion ou de stabilité du transplant. Ces résultats ont fait l'objet d'un dépôt de brevet, présenté en Annexe 2.

Article paru dans Transplantation Proceedings (novembre 2010)

## **Biomarkers for the diagnosis of the stable kidney transplant and chronic transplant injury using the ProtoArray® technology**

Sandrine Le Roux<sup>1</sup>, Anne Devys<sup>3</sup>, Cécile Girard<sup>2</sup>, Jean Harb<sup>1,4\*</sup> and Maryvonne Hourmant<sup>1, 2\*</sup>

<sup>1</sup>: INSERM, UMR 643, Immeuble Jean Monnet. Hôtel-Dieu. 30 boulevard Jean Monnet. 44093 Nantes Cedex. France

<sup>2</sup>: Service de Néphrologie et d'Immunologie Clinique. Immeuble Jean Monnet. Hôtel-Dieu. 30 boulevard Jean Monnet. 44093 Nantes cédex. France

<sup>3</sup>: EFS de Nantes, Laboratoire d'histocompatibilité, 32 Boulevard Jean Monnet 44093 Nantes Cedex France

\* Both authors contributed equally.

**Authorship:** Sandrine Le Roux is “performed research”, Anne Devys is “contributed important reagents”, Cécile Girard is “collected data”, Jean Harb and Maryvonne Hourmant are “designed research” and wrote paper.

**Funding sources:** This study was supported by a grant of the joint INSERM and DHOS translational research programme

**Corresponding author:** Jean Harb: INSERM UMR 643, CHU Hôtel Dieu, 30, Bd Jean Monnet, 44093 Nantes Cédex 01, France; Tel: +33240087424; Fax: +33240087411; e-mail: [jean.harb@univ-nantes.fr](mailto:jean.harb@univ-nantes.fr)

**Running title:** Proteic biomarkers in graft disorders

## Abstract

**Background:** Transplant Glomerulopathy (TG) is the best characterised form of chronic rejection in renal transplantation, carrying a poor prognosis. In clinical routine, it has to be differentiated from the entity defined by the Banff'05 classification as Interstitial Fibrosis and Tubular Atrophy (IFTA). Sequential transplant biopsies have shown that their lesions are subclinical a long time before clinical manifestations occur. The availability of biomarkers could allow an earlier diagnosis and subsequently earlier treatment. **Aim:** The aim of our study was to identify serum biomarkers in kidney recipients having TG by comparison with patients having IFTA and stable patients, using the protein microarray technology. **Methods:** Protein arrays are designed to detect auto or alloantibodies in patient serum. Our study is one of the first evaluations in renal transplantation. We selected 13 TG patients, 10 IFTA patients and 6 stable patients and screened their sera on protoarrays to identify unique biomarkers specific of each kidney graft status **Results:** We have identified, with a high statistical significance, 18 antibody reactivities specific for TG, 11 for IFTA and 10 in stable patients. These biomarkers might be used in the diagnosis of chronic lesions of the allograft, after validation on a larger cohort of patients. In addition, the targets identified, such as podocan and collagen XXIII in TG and tubular cell ion channels in IFTA, and their cellular functions, could possibly give insights into the pathogenesis of the lesions.

**Keywords:** protein microarray, autoimmunity, biomarker, transplant glomerulopathy, IFTA, stable transplant.

**Abbreviations:** TG: transplant glomerulopathy; IFTA: interstitial fibrosis and tubular atrophy; CAN: chronic allograft nephropathy. DSA: donor specific antibodies

## Introduction

Transplant glomerulopathy (TG) is one of the main chronic lesions of the transplant that correlates with reduced graft survival (1, 2). TG is a rare entity in the first year post-transplant but its incidence increases with time, 4% at 1 year to 20% at 5 years post-transplant(1). Following a large amount of publications in the last years, the Banff 05 classification has established diagnostic criteria for the chronic antibody-mediated rejection, to which TG belongs (3). TG is defined by the presence of glomerular double contours and, the detection of the complement product C4d and the presence of HLA antibodies, donor specific (DSA) in 80% of the cases (1). Chronic allograft nephropathy (CAN), a more generic denomination that represented all late scarrings of the graft due to immunologic and non-immunologic injuries, has also been revisited in the Banff 05 classification. The common lesion is the association of interstitial fibrosis and tubular atrophy (IFTA). The Banff'05 classification splitted the IFTA group into IFTA with no evidence of specific etiology and IFTA with morphological features enabling the diagnosis of specific causes such as calcineurin inhibitor toxicity, hypertension, viral or bacterial infection and changes due to acute or chronic rejection. In clinical practice, TG and IFTA have to be differentiated for appropriate therapeutic management.

The practice of protocol biopsies of the kidney transplant has led to the notion that chronic lesions are present much earlier than clinical manifestations. From systematic sequential biopsies performed between one month and 10 years post-transplant, the team of Nankivell and Chapman in Sydney described the natural history of TG and CAN (2, 4). They reported that Banff grade I CAN was already present in 94.2% of the patients at 1 year and that 99.8% had grade II or III at 10 years (4). Similarly, TG was detected at a sub-clinical stage by protocol biopsies, 2 to 3 years post-transplant versus 4-8 years in biopsies for cause (5, 6) and its lesions were induced by endothelial injury, that occurred as soon as 1-3 months after transplantation (2).

Systematic biopsies are not easily repeated in the routine practice of kidney transplantation, because of the risk of bleeding that in fact is unfrequent. One or two are generally performed per patient, at 3 and/or 12 months post-transplant. Consequently, although informative, they give insights in the transplant lesions at one single moment. The availability of biomarkers could encompass this problem, with the great advantage of allowing an early

diagnosis of the chronic pathologies. Indeed, the emergence of new technologies for the genome and proteome analysis offers potential for non invasive diagnostic tools, which should also be useful to evaluate the efficacy of subsequent therapeutic interventions. In addition, they could improve our knowledge of TG and IFTA pathogenesis.

Genomic biomarkers have first been explored, mainly in acute rejection and delayed graft function with a major contribution of the Edmonton team. More recently, a number of studies have used mass spectrometry (MS), including SELDI-MS, for the analysis of the urinary proteome and either protein peaks or defined proteins were identified as biomarkers of acute rejection (7, 8). Interesting results have also been reported in chronic rejection by both technologies. Studies based on genomics found that the presence in the blood of the RNA of Tribbles1 (9) correlated with chronic active antibody-mediated rejection, while several urinary biomarkers detected by MS were able to discriminate between chronic active antibody-mediated rejection and IFTA (10). These encouraging data have to be validated.

In this study, we used protein microarrays that identify the targets of antibodies present in patients' sera. They have already been used to profile serum antibody levels in cancers and autoimmune diseases (11) . The rationale under our choice was that there are arguments for an auto-immune component in TG as well as in chronic rejection of other organ transplants.

Using this technology, we were able to identify antibodies directed against protein biomarkers in the blood of patients with TG by comparison with stable transplanted patients or patients having pure IFTA.

## Materials and Methods

### **Patients and material**

Thirteen patients with TG and 10 with IFTA were selected for the study according to the results of a biopsy performed for cause. Histological diagnosis was made according to the Banff'05 classification. TG criteria included GBM double contours, C4d deposition and circulating donor-specific HLA antibodies (DSA). IFTA was defined as interstitial fibrosis and tubular atrophy without any specific etiology. A third group consisted of transplanted patients with good and stable renal function, without proteinuria. To ascertain they had normal histology, they were selected among patients having systematic one-year biopsy.

All patients had been transplanted at our institution between 1986 and 2006. Clinical data were extracted from a computerized and validated database (DIVAT network).

Since 1998, one serum is annually harvested for every recipient in our center. Accordingly, a serum close to the time of the biopsy was available for each patient of the study who had a biopsy for cause. These sera were routinely monitored for HLA antibodies (LabScreen® PRA class I and class II One Lambda, Canoga Park, USA). The serum was obtained on the day of the biopsy for patients who had a protocol biopsy and also monitored for HLA antibodies. These sera, stored at -80°C, were used for the ProtoArrays® after the patient gave an informed written consent.

The study was approved by the Nantes University Hospital Ethical Committee and the Committee for the Protection of Patients from Biological Risks, in accordance with the Declaration of Helsinki.

### **The protein microarrays technology**

The aim of protein microarrays is to identify, by screening over a large panel of proteins, the targets of antibodies present in patients' sera.

The sera of the 3 groups of patients were screened by e ProtoArrays® Human Protein Microarrays v4.0 of Invitrogen™ (Invitrogen Corporation, Brandford, CT, USA) who performed the synthesis of arrays, probing, acquisition and analysis of the data generated, as follows.

### **Human protein collection and Protein Microarray Manufacture**

Over 8000 human clones obtained from Invitrogen's Ultimate ORF collection and Gateway collection of kinase clones were transferred into insect cells via baculovirus infection to produce recombinant proteins tagged with Glutathione-S-Transferase (GST). Recombinant proteins were then purified using GST affinity, under native conditions. Because of the insect cell production and the particular purification conditions, proteins are expected to contain appropriate posttranslational modifications and maintain their native conformations. A contact-type printer equipped with 48 matched quill-type pins printed the recombinant proteins in duplicates on a glass slide coated with a thin layer of nitrocellulose.

### **Protein Microarray Probing**

Once printed with duplicates of recombinant proteins and appropriate negative and positive controls, microarray slides were blocked in blocking buffer containing 50 mM HEPES, 200 mM NaCl, 0,08% Triton X-100, 25% glycerol, 20 mM reduced glutathione, 1.0 mM DTT and 1% BSA, at 4°C for 1 hour. Microarrays were then probed with a 1:500 dilution of serum sample (one microarray per serum) diluted in 5 ml of freshly prepared PBST buffer and incubated for 90 minutes at 4°C with gentle agitation. Microarrays were washed five times in 5 ml PBST buffer. Slides were incubated with an Alexa Fluor®647-conjugated goat anti-human IgG antibody diluted in 5 ml probe buffer to a 1 µg/ml final concentration at 4°C for 90 minutes. After incubation, slides were washed as described above and dried by spinning in a table top centrifuge equipped with a plate rotor at 1000 rpm for 2 minutes. Arrays were then scanned using an Axon GenePix 4000B fluorescent microarray scanner.

### **Data acquisition and analysis**

GenePix 6.0 was used for data acquisition. This software overlay the mapping of human proteins in the array list file to each array image with a fixed feature size of 130 µm (diameter). AlexaFluor®647-conjugated goat anti-human IgG antibody printed on each subarray helps aligning the spots. Other proteins were systematically used as control spots, e.g. anti-biotin antibodies which are recognized by the detection IgG antibody and the Influenza A antigen, detected in 95% of the total population. Scanner settings were selected such that maximal signals on the array were sub-saturated thus ensuring that the full dynamic range of the scanner was utilized.

## **Statistical analysis**

Data analysis was performed with the Invitrogen's ProtoArray Prospector software. This software follows a 3-step process:

- 1) A panel of values was calculated for each protein array including the Z score, the Chebyshev Inequality Precision (CIP) value and the coefficient of variation (CV) value. The Z score is the signal value for a given spot minus the mean signal value from all the human proteins on the array, divided by the standard deviation of the signal values for all the human proteins on the array. The CIP value evaluates the signal strength for a given spot relative to all negative control spots and calculates the probability that the observed signal may come from the negative control distribution. The CV evaluates standard deviation between duplicates. A Z score > 3, a CIP value < 0.05 and a CV < 0.5 define a positive spot.
- 2) Group characterization: Signals for each individual protein across all samples from a given population were aligned for downstream analysis
- 3) Identification of the differences between the sample populations was performed using M-statistics (Invitrogen's ProtoArray Prospector software)

This test identifies proteins reaching high level recognition in one group compared to another one. M-statistic test thus provides one list of candidate biomarkers for each of the two groups analyzed. M-statistic test was performed for every possible two-group comparison. The different lists were then added to obtain total biomarkers specific of each group. Finally total biomarker lists were compared across all others to exclude biomarkers that could be present in more than one list. Only unique biomarkers, specific of each group were selected.

## Results

### Study population

13 patients in the TG group had a transplant biopsy between 9 and 180 months post-transplant (mean: 61.8 months) for the onset of proteinuria and/or transplant dysfunction. The histological lesions were concordant with the diagnosis of TG according to the 05 Banff classification. In addition, DSA were identified in 8 of them and C4d deposition was present in the transplant in 10 cases, including the 5 patients without DSA. Finally, the 13 patients had at least 2 out of 3 diagnosis criteria for active chronic humoral rejection. Ten patients were included in the IF/TA group. The interval between transplantation and biopsy was longer than in the TG group (92.6 months) but due to large standard deviations, the difference was not statistically significant. None of the patients had DSA and there was no C4d staining on biopsy. Stable patients (N = 6) were 11.4 months post-transplant, had normal transplant function, no DSA and no C4d deposition in the transplant. Two of them were combined kidney and pancreas transplanted patients and their glycemia was strictly normal (table 1).

In the TG group, 11 over 13 patients received, at the time of the transplant biopsy, Tacrolimus, alone in one, as bitherapy with Mycophenolate Mofetil (MMF) in 6 or Prednisone in one, as triple therapy with MMF and Prednisone in 3. The other 2 patients received Cyclosporine A (CsA), with MMF in one and Everolimus in one. In the IFTA group, the immunosuppressive treatment consisted in Tacrolimus in 4 in combination with MMF in 3 and Azathioprine in one. Six patients were under CsA, as monotherapy in one patient, as bitherapy with MMF in 2, Azathioprine in one and Everolimus in one and as triple therapy with MMF and Prednisone in one. Five patients of the stable function group received Tacrolimus-MMF with low dose Prednisone in 2. The last patient was included in a protocol of long term Belatacept administered with MMF and steroids.

### Identification of candidate biomarkers in TG, IFTA and stable patients

Eighteen candidate biomarkers were identified as being specific to the TG group, when compared with the other groups. These biomarkers are listed in table 2. Interestingly, among them, Collagen XXIII and Podocan are especially relevant to a process involving the GBM (12, 13). Histocompatibility 13 transcript variant 4 is required to generate on lymphocyte cell surface HLA-E epitopes from HLA class I molecules but also catalyzes proteolysis and is highly

expressed in the kidney (14). The TGF $\beta$  stimulated clone 22 domain family members including member 3 (TSC22D3) are expressed, at least in the mouse, in renal cortex, medulla and papilla and have been shown to play a role in the adaptation of renal cells to hypertonicity (15). Zinc finger protein 174 is involved in regulation of transcription (16), the TRAF family member in signal transduction (17), MAP3K11 (18) and PKC Delta binding protein (19) in cell cycle, Epsin 1 (20) and RAB22A (21) in endocytosis, Glutaredoxin 5 in cell redox homeostasis (22), Flap structure-specific endonuclease 1 in DNA replication and repair (23). Crumbs homolog 3 is crucial for the maintenance of epithelial polarity and the integrity of mammalian tight junctions and is highly expressed in the kidney (24) (table 2).

Eleven candidate biomarkers were found to be specific to the IF/TA group (table 3). Some are mediators in the immune response such as IL16 (25). Myeloid leukemia factor 1 is a negative regulator of cell cycle progression functioning upstream of the suppressor gene p53 (26) and Cyclin 2 is also involved in cell cycle (27).  $\alpha$ 2 tubulin is a component of the microtubules (28). Nedd 4 family interacting protein 2 is an adaptor protein for the Nedd4 proteins that are ubiquitin ligases (29), playing a role in protein degradation and trafficking via exosomes. F11 receptor, described in platelets, is an important regulator of tight junction assembly in epithelia and can act as a ligand for LFA1 (30). Sorting nexin family member 21 belongs to a family of proteins involved in membrane trafficking and sorting processes such as growth factor receptors (31). Mucin 20 has been described in IgA nephropathy where it is up-regulated and its polymorphism associated with the renal prognosis (32). Interestingly, several biomarkers are membrane ATPases present on tubular cells (Na K ATPase) or associated proteins, such as Nedd4, which regulates the expression of epithelial Na channel ENaC (29, 33) (table 3).

Ten biomarkers were identified as being unique for the Stable group. As indicated in table 4, one of them is a member of the cytochrome P450 family (34). Actin related protein 2/3 complex subunit 1B is a component of this complex, involved in the regulation of actin polymerization, and has been demonstrated to colocalize with F-actin structures and CD2-associated protein in podocytes (35). Cell division cycle 20 is required for full ubiquitin ligase activity during mitotic cell cycle (36). Ras like without CAAX1 is a small GTPase mediating signal transduction and binding calmodulin (37). Leucin rich repeat interacting protein 1 regulates transcription but also acts as a repressor for TNF $\alpha$ , EGF receptor and PDGFA expression (38). The PHD Finger (PHD Finger Protein 21B) is found in human proteins where it is involved in chromatin regulation (39). Chemokine-like factor transcript variant1 plays a role in inflammation by inducing lymphocyte proliferation and macrophage and neutrophil chemotaxis (40) (table 4).

## Discussion

This study is one of the very first using protein microarrays for the detection of biomarkers in kidney transplantation. Protein microarrays are new tools to identify antigen biomarkers recognized by patients sera, that can be auto or alloantigens in transplanted patients. Antibodies displaying increased reactivity as a consequence of increased abundance are considered to be biomarkers for patient pathology. Microarrays have been successfully used to profile serum antibody levels in patients with various diseases such as cancer (41, 42) and autoimmune diseases (43-45). By comparison with the other proteomic tool for biomarker discovery, such as mass spectrometry, proteomic microarrays identify the individual proteins and give clues to understand the pathophysiology of the lesions. We have selected protein microarrays for biomarker investigation in our patients as there are arguments for an autoimmune component in chronic rejection. In an animal model of chronic rejection and later in patients with TG, antibodies against heparansulphates of the glomerular basement membrane have been identified, perlecan in the rat (46), agrin in human (47). Similarly, antibodies have been described against the endothelial protein Vimentin in chronic allograft vasculopathy of the cardiac transplant (48) and against air way epithelial cells in bronchiolitis obliterans (49). Antibodies against the angiotensine 2 receptor 1 on endothelial cells have also been incriminated in acute humoral rejection of the kidney transplant, characterized by an uncommon high grade hypertension (50).

Protein microarrays identified specific biomarkers in our 3 groups of patients, patients with TG, IFTA without specific etiology, and stable patients. Many of these candidates have a high expression in the kidney and at the cellular level, are located on cell membrane, in the nucleus or cytoplasm. Whatever the group of patients, most of our candidate biomarkers are involved in signal transduction, transcription regulation, DNA replication and repair, cell cycle, endocytosis, cell redox and glycolysis. The detection of a high number of molecules with such functions could suggest the intervention of an apoptosis process and some are indeed known as mediators of apoptosis. Clearance deficiency of apoptotic cells is one mechanism of autoimmunity and is supposed to play a pivotal role in the induction of SLE (51). According to this theory, apoptotic cells that are not eliminated in time continue their death program towards secondary necrosis in which plasma membrane integrity is lost, the intra-cellular content, including nuclear and cytoplasmic modified proteins, is released and exposed to immune cells. The modified proteins induce antibody production such as DNA

antibodies in SLE. In addition, phagocytosis of necrotic cells lead to dendritic cell maturation and macrophage activation, triggering pro-inflammatory response and rupture of tolerance (52). A similar mechanism could be proposed here, considering the nature of the biomarkers identified in our study. In addition to molecules that could be released by advanced apoptosis, inflammatory mediators are present among the biomarkers such as IL16. An autoimmune process is expected in TG where binding of HLA antibodies on endothelial cells could be the initial event leading to apoptosis. Similar antibodies are present in IFTA and we can suppose that, whatever the causative hit, lesions of tubular cells could result in antibody production.

Among the specific biomarkers of the TG and IFTA groups, some seem to be especially relevant to the pathology. In TG, antibodies against GBM components, Collagen XXIII and Podocan, were found. Collagen XXIII is a member of the transmembranous subfamily of collagens that has dual functions as matrix component but also as cell surface receptor. The precise role of Collagen XXIII that is expressed in the kidney is unknown. In other tissues, Collagen XXIII was shown to co-stain with Laminin and it is supposed that it interacts with the basement membrane without being one of its component (12). Podocan is a recently identified member of the small leucin-rich repeat proteoglycan (SLRP), that binds type 1 collagen (53) and is produced by podocytes and vascular endothelial cells and expressed in the GBM (13). It has been detected in the sclerotic glomerular lesions of experimental HIV-associated nephropathy (13). The SRLP family members have been shown to interact with collagen fibrillogenesis and it is hypothesized that podocan modulates collagen fibrils in the mature GBM, while helping to maintain the integrity of the glomerular filtration barrier. As the others SRLP, podocan has anti-migratory and anti-proliferative properties concomitant with changes in p21 and Rho activity (13). In addition to the glomerulus, it is also expressed in the heart and vascular smooth muscle cells and as such is thought to play a role in atherosclerosis (13).

IFTA biomarkers suggest lesions of the tubular cells and associated inflammation. They included channels on tubular cells, such as the NA-K ATPase (NA-K ATPase alpha 3 polypeptide), that energises transcellular NaCl reabsorption. The Nedd4 family-interacting proteins are involved in recruitment of Nedd4 proteins in exosomes and this process is thought to be a route for elimination of proteins during stress (54). In addition, Nedd4-2 has a central role in regulation at the plasma membrane of the epithelial sodium channel EnaC, responsible for Na uptake in the distal nephron (29). Nedd4-2 also regulates the Tweety family of chloride ion channels (55).  $\beta$ -tubulin as member of the microtubulin network is

required for the transport of cGMP into the extracellular space to modulate NO-and pressure-induced natriuresis (28). Finally IL16 is an interesting biomarker that functions as a chemokine for recruitment of leukocytes in the development of local inflammation. It is constitutively and highly expressed by tubular cells as well as produced by CD8+ cells and is released from a pro-form by cleavage by caspase 3 (56), that is crucial in apoptosis. It has recently been shown that IL16 deficient mice or mice treated with an anti-IL16 antibody have reduced lesions in a model of reperfusion injury (25).

Ten biomarkers were identified as being unique in stable recipients and surprisingly, the corresponding antigens were important molecules in cell functions. The determinants of immunization against these proteins have to be elucidated but it is easy to imagine that even a well functioning transplant has unavoidable cellular lesions. These findings suggest that some antibodies are epiphenomenon. However, it is interesting to remind that autoantibodies against CYP2E1, that can be detected in autoimmune and hepatic diseases (34), have also been reported in hepatitis C recurrence after liver transplantation, where their titer correlated with the presence and intensity of necrotic lesions (57).

Surprisingly, the lists of proteins reported here are different from that very recently published in 18 pediatric renal transplant recipients (58). This study that was the first to use protein microarrays in transplanted patients and the Protoarrays was the previous version from Invitrogen, with 5056 targets expressed. The identified proteins were mainly proteins from the pelvis and renal cortex and their presence is difficult to interpret as patients were selected independently of their transplant status and underlying pathology. Similarly a very recent paper using the same technology in acute rejection in pediatric renal transplant recipients shows antibodies against protein kinase C $\zeta$  (59).

Our study has several limitations. The cohort of patients is small and heterogeneous regarding immunosuppressive treatment and delay between transplantation and the date of the serum tested. Stable patients are around one year post-transplantation and their selection was based on the fact that a biopsy was thought necessary to ascertain that they did not have subclinical lesions of TG or IFTA. In TG and IFTA patients, mean times post-transplant were not significantly different; this lets suppose that the possible antibody background related with the age of transplantation was not different.

In conclusion, we have identified, by the new technique of protein microarrays, biomarkers of transplant glomerulopathy and interstitial fibrosis and tubular atrophy as defined by the Banff classification and of transplant stability. This work is still preliminary and these findings

have to be validated by another test such as ELISA and in a larger cohort of transplanted patients, with the further objective of developing a diagnostic test for chronic pathologies of kidney transplant. In addition, these biomarkers should give insights into the mechanism of their lesions. At this point, the role of the antibodies produced against the targets identified remains unclear and it cannot be ascertained if they are epiphenomenon or have a true pathogenic role.

## References

- (1). Cosio FG, Gloor JM, Sethi S, Stegall MD. Transplant glomerulopathy. *Am J Transplant* 2008;8(3):492-496.
- (2). Wavamunno MD, O'Connell PJ, Vitalone M, et al. Transplant glomerulopathy: ultrastructural abnormalities occur early in longitudinal analysis of protocol biopsies. *Am J Transplant* 2007;7(12):2757-2768.
- (3). Solez K, Colvin RB, Racusen LC, et al. Banff '05 Meeting Report: differential diagnosis of chronic allograft injury and elimination of chronic allograft nephropathy ('CAN'). *Am J Transplant* 2007;7(3):518-526.
- (4). Nankivell BJ, Borrows RJ, Fung CL, O'Connell PJ, Allen RD, Chapman JR. The natural history of chronic allograft nephropathy. *N Engl J Med* 2003;349(24):2326-2333.
- (5). Regele H, Bohmig GA, Habicht A, et al. Capillary deposition of complement split product C4d in renal allografts is associated with basement membrane injury in peritubular and glomerular capillaries: a contribution of humoral immunity to chronic allograft rejection. *J Am Soc Nephrol* 2002;13(9):2371-2380.
- (6). Sijpkens YW, Joosten SA, Wong MC, et al. Immunologic risk factors and glomerular C4d deposits in chronic transplant glomerulopathy. *Kidney Int* 2004;65(6):2409-2418.
- (7). O'Riordan E, Orlova TN, Podust VN, et al. Characterization of urinary peptide biomarkers of acute rejection in renal allografts. *Am J Transplant* 2007;7(4):930-940.
- (8). McManus C, Rose ML, Dunn MJ. Proteomics of transplant rejection. *Transplant Rev* 2006;20(4):195-207.
- (9). Ashton-Chess J, Giral M, Mengel M, et al. Tribbles-1 as a novel biomarker of chronic antibody-mediated rejection. *J Am Soc Nephrol* 2008;19(6):1116-1127.
- (10). Quintana LF, Sole-Gonzalez A, Kalko SG, et al. Urine proteomics to detect biomarkers for chronic allograft dysfunction. *J Am Soc Nephrol* 2009;20(2):428-435.
- (11). Babel I, Barderas R, Diaz-Uriarte R, Martinez-Torrecuadrada JL, Sanchez-Carbayo M, Casal JI. Identification of tumor-associated autoantigens for the diagnosis of colorectal cancer in serum using high density protein microarrays. *Mol Cell Proteomics* 2009;8(10):2382-95.
- (12). Koch M, Veit G, Stricker S, et al. Expression of type XXIII collagen mRNA and protein. *J Biol Chem* 2006;281(30):21546-21557.

- (13). Ross MD, Bruggeman LA, Hanss B, et al. Podocan, a novel small leucine-rich repeat protein expressed in the sclerotic glomerular lesion of experimental HIV-associated nephropathy. *J Biol Chem* 2003;278(35):33248-33255.
- (14). Lemberg MK, Bland FA, Weihofen A, Braud VM, Martoglio B. Intramembrane proteolysis of signal peptides: an essential step in the generation of HLA-E epitopes. *J Immunol* 2001;167(11):6441-6446.
- (15). Fiol DF, Mak SK, Kultz D. Specific TSC22 domain transcripts are hypertonically induced and alternatively spliced to protect mouse kidney cells during osmotic stress. *Febs J* 2007;274(1):109-124.
- (16). Williams AJ, Khachigian LM, Shows T, Collins T. Isolation and characterization of a novel zinc-finger protein with transcription repressor activity. *J Biol Chem* 1995;270(38):22143-22152.
- (17). Rothe M, Xiong J, Shu HB, Williamson K, Goddard A, Goeddel DV. I-TRAF is a novel TRAF-interacting protein that regulates TRAF-mediated signal transduction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996;93(16):8241-8246.
- (18). Nagata K, Puls A, Futter C, et al. The MAP kinase kinase kinase MLK2 co-localizes with activated JNK along microtubules and associates with kinesin superfamily motor KIF3. *Embo J* 1998;17(1):149-158.
- (19). Olsen JV, Blagoev B, Gnad F, et al. Global, *in vivo*, and site-specific phosphorylation dynamics in signaling networks. *Cell* 2006;127(3):635-648.
- (20). Morinaka K, Koyama S, Nakashima S, et al. Epsin binds to the EH domain of POB1 and regulates receptor-mediated endocytosis. *Oncogene* 1999;18(43):5915-5922.
- (21). Opdam FJ, Kamps G, Croes H, van Bokhoven H, Ginsel LA, Fransen JA. Expression of Rab small GTPases in epithelial Caco-2 cells: Rab21 is an apically located GTP-binding protein in polarised intestinal epithelial cells. *Eur J Cell Biol* 2000;79(5):308-316.
- (22). Wingert RA, Galloway JL, Barut B, et al. Deficiency of glutaredoxin 5 reveals Fe-S clusters are required for vertebrate haem synthesis. *Nature* 2005;436(7053):1035-1039.
- (23). Hiraoka LR, Harrington JJ, Gerhard DS, Lieber MR, Hsieh CL. Sequence of human FEN-1, a structure-specific endonuclease, and chromosomal localization of the gene (FEN1) in mouse and human. *Genomics* 1995;25(1):220-225.
- (24). Lemmers C, Medina E, Delgrossi MH, Michel D, Arsanto JP, Le Bivic A. hINADI/PATJ, a homolog of discs lost, interacts with crumbs and localizes to tight junctions in human epithelial cells. *J Biol Chem* 2002;277(28):25408-25415.
- (25). Wang S, Diao H, Guan Q, et al. Decreased renal ischemia-reperfusion injury by IL-16 inactivation. *Kidney Int* 2008;73(3):318-326.

- (26). Yoneda-Kato N, Tomoda K, Umehara M, Arata Y, Kato JY. Myeloid leukemia factor 1 regulates p53 by suppressing COP1 via COP9 signalosome subunit 3. *Embo J* 2005;24(9):1739-1749.
- (27). Lauper N, Beck AR, Cariou S, et al. Cyclin E2: a novel CDK2 partner in the late G1 and S phases of the mammalian cell cycle. *Oncogene* 1998;17(20):2637-2643.
- (28). Park J, Kemp BA, Howell NL, Gildea JJ, Keller SR, Carey RM. Intact microtubules are required for natriuretic responses to nitric oxide and increased renal perfusion pressure. *Hypertension* 2008;51(2):494-499.
- (29). Wiemuth D, Ke Y, Rohlfs M, McDonald FJ. Epithelial sodium channel (ENaC) is multi-ubiquitinated at the cell surface. *Biochem J* 2007;405(1):147-155.
- (30). Liu Y, Nusrat A, Schnell FJ, et al. Human junction adhesion molecule regulates tight junction resealing in epithelia. *J Cell Sci* 2000;113 (Pt 13):2363-2374.
- (31). Zeng W, Yuan W, Wang Y, et al. Expression of a novel member of sorting nexin gene family, SNX-L, in human liver development. *Biochem Biophys Res Commun* 2002;299(4):542-548.
- (32). Li G, Zhang H, Lv J, Hou P, Wang H. Tandem repeats polymorphism of MUC20 is an independent factor for the progression of immunoglobulin A nephropathy. *Am J Nephrol* 2006;26(1):43-49.
- (33). Greger R. Ion transport mechanisms in thick ascending limb of Henle's loop of mammalian nephron. *Physiol Rev* 1985;65(3):760-797.
- (34). Manns MP, Obermayer-Straub P. Cytochromes P450 and uridine triphosphate-glucuronosyltransferases: model autoantigens to study drug-induced, virus-induced, and autoimmune liver disease. *Hepatology* 1997;26(4):1054-1066.
- (35). Welsch T, Endlich N, Kriz W, Endlich K. CD2AP and p130Cas localize to different F-actin structures in podocytes. *Am J Physiol Renal Physiol* 2001;281(4):F769-F777.
- (36). Weinstein J, Jacobsen FW, Hsu-Chen J, Wu T, Baum LG. A novel mammalian protein, p55CDC, present in dividing cells is associated with protein kinase activity and has homology to the *Saccharomyces cerevisiae* cell division cycle proteins Cdc20 and Cdc4. *Mol Cell Biol* 1994;14(5):3350-3363.
- (37). Wes PD, Yu M, Montell C. RIC, a calmodulin-binding Ras-like GTPase. *Embo J* 1996;15(21):5839-5348.
- (38). Suriano AR, Sanford AN, Kim N, et al. GCF2/LRRFIP1 represses tumor necrosis factor alpha expression. *Mol Cell Biol* 2005;25(20):9073-9081.
- (39). Collins JE, Wright CL, Edwards CA, et al. A genome annotation-driven approach to cloning the human ORFeome. *Genome Biol* 2004;5(10):R84.

- (40). Han W, Lou Y, Tang J, et al. Molecular cloning and characterization of chemokine-like factor 1 (CKLF1), a novel human cytokine with unique structure and potential chemotactic activity. *Biochem J* 2001;357(Pt 1):127-135.
- (41). Hudson ME, Pozdnyakova I, Haines K, Mor G, Snyder M. Identification of differentially expressed proteins in ovarian cancer using high-density protein microarrays. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007;104(44):17494-17499.
- (42). Nam MJ, Madoz-Gurpide J, Wang H, et al. Molecular profiling of the immune response in colon cancer using protein microarrays: occurrence of autoantibodies to ubiquitin C-terminal hydrolase L3. *Proteomics* 2003;3(11):2108-2115.
- (43). Horn S, Lueking A, Murphy D, et al. Profiling humoral autoimmune repertoire of dilated cardiomyopathy (DCM) patients and development of a disease-associated protein chip. *Proteomics* 2006;6(2):605-613.
- (44). Lalive PH, Menge T, Barman I, Cree BA, Genain CP. Identification of new serum autoantibodies in neuromyelitis optica using protein microarrays. *Neurology* 2006;67(1):176-177.
- (45). Auger I, Balandraud N, Rak J, Lambert N, Martin M, Roudier J. New autoantigens in rheumatoid arthritis (RA): screening 8268 protein arrays with sera from patients with RA. *Ann Rheum Dis* 2009;68(4):591-594.
- (46). Joosten SA, van Dixhoorn MG, Borrias MC, et al. Antibody response against perlecan and collagen types IV and VI in chronic renal allograft rejection in the rat. *Am J Pathol* 2002;160(4):1301-1310.
- (47). Joosten SA, Sijpkens YW, van Ham V, et al. Antibody response against the glomerular basement membrane protein agrin in patients with transplant glomerulopathy. *Am J Transplant* 2005;5(2):383-393.
- (48). Jurcevic S, Ainsworth ME, Pomerance A, et al. Antivimentin antibodies are an independent predictor of transplant-associated coronary artery disease after cardiac transplantation. *Transplantation* 2001;71(7):886-892.
- (49). Jaramillo A, Naziruddin B, Zhang L, et al. Activation of human airway epithelial cells by non-HLA antibodies developed after lung transplantation: a potential etiological factor for bronchiolitis obliterans syndrome. *Transplantation* 2001;71(7):966-976.
- (50). Dragun D, Muller DN, Brasen JH, et al. Angiotensin II type 1-receptor activating antibodies in renal-allograft rejection. *N Engl J Med* 2005;352(6):558-569.
- (51). Janko C, Schorn C, Grossmayer GE, et al. Inflammatory clearance of apoptotic remnants in systemic lupus erythematosus (SLE). *Autoimmun Rev* 2008;8(1):9-12.
- (52). Roos A, Xu W, Castellano G, et al. Mini-review: A pivotal role for innate immunity in the clearance of apoptotic cells. *Eur J Immunol* 2004;34(4):921-929.

- (53). Shimizu-Hirota R, Sasamura H, Kuroda M, Kobayashi E, Saruta T. Functional characterization of podocan, a member of a new class in the small leucine-rich repeat protein family. *FEBS Lett* 2004;563(1-3):69-74.
- (54). Putz U, Howitt J, Lackovic J, et al. Nedd4 family-interacting protein 1 (Ndfip1) is required for the exosomal secretion of Nedd4 family proteins. *J Biol Chem* 2008;283(47):32621-32627.
- (55). He Y, Hryciw DH, Carroll ML, et al. The ubiquitin-protein ligase Nedd4-2 differentially interacts with and regulates members of the Tweety family of chloride ion channels. *J Biol Chem* 2008;283(35):24000-24010.
- (56). Zhang Y, Center DM, Wu DM, et al. Processing and activation of pro-interleukin-16 by caspase-3. *J Biol Chem* 1998;273(2):1144-1149.
- (57). Rigamonti C, Vidali M, Donato MF, et al. Serum autoantibodies against cytochrome P450 2E1 (CYP2E1) predict severity of necroinflammation of recurrent hepatitis C. *Am J Transplant* 2009;9(3):601-609.
- (58). Li L, Wadia P, Chen R, et al. Identifying compartment-specific non-HLA targets after renal transplantation by integrating transcriptome and "antibodyome" measures. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009;106(11):4148-4153.
- (59). Sutherland SM, Li L, Sigdel TK, et al. Protein microarrays identify antibodies to protein kinase Czeta that are associated with a greater risk of allograft loss in pediatric renal transplant recipients. *Kidney Int* 2009;76(12):1277-83.
- (60). Cheung CL, Chan BY, Chan V, et al. Pre-B-cell leukemia homeobox 1 (PBX1) shows functional and possible genetic association with bone mineral density variation. *Hum Mol Genet* 2009;18(4):679-687.
- (61). Dreger M, Bengtsson L, Schoneberg T, Otto H, Hucho F. Nuclear envelope proteomics: novel integral membrane proteins of the inner nuclear membrane. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98(21):11943-11948.
- (62). Omori Y, Suzuki M, Ozaki K, et al. Expression and chromosomal localization of KIAA0369, a putative kinase structurally related to Doublecortin. *J Hum Genet* 1998;43(3):169-177.
- (63). Cambot M, Aresta S, Kahn-Perles B, de Gunzburg J, Romeo PH. Human immune associated nucleotide 1: a member of a new guanosine triphosphatase family expressed in resting T and B cells. *Blood* 2002;99(9):3293-3301.
- (64). Becker W, Weber Y, Wetzel K, Eirmbter K, Tejedor FJ, Joost HG. Sequence characteristics, subcellular localization, and substrate specificity of DYRK-related kinases, a novel family of dual specificity protein kinases. *J Biol Chem* 1998;273(40):25893-25902.

- (65). Peng J, Yu L, Horiuchi M, et al. Identification of human CDV-1R and mouse Cdv-1R, two novel proteins with putative signal peptides, especially highly expressed in testis and increased with the male sex maturation. *Mol Biol Rep* 2002;29(4):353-362.
- (66). Scherl A, Coute Y, Deon C, et al. Functional proteomic analysis of human nucleolus. *Mol Biol Cell* 2002;13(11):4100-4109.
- (67). Liang Y, Buckley TR, Tu L, Langdon SD, Tedder TF. Structural organization of the human MS4A gene cluster on Chromosome 11q12. *Immunogenetics* 2001;53(5):357-368.
- (68). Deloukas P, Matthews LH, Ashurst J, et al. The DNA sequence and comparative analysis of human chromosome 20. *Nature* 2001;414(6866):865-871.

## Table legends

### **Table 1: patients characteristics**

Characteristics of TG, IFTA and Stable patients are indicated in the table. Stable patients have statistically significant differences in months post-transplant, serum creatinin and proteinuria values compared to TG and IFTA patients ( $p<0.05$ ). No significant difference is observed in recipient's age, months post-transplant, serum creatinin or proteinuria between TG and IFTA patients.

### **Table 2: TG biomarkers**

Biomarkers significantly more recognized by TG patients than IFTA and Stable patients ( $p<0.05$ ). Names, accession number and references related to the 18 selected TG biomarkers are indicated. Biomarkers are ordered by cellular localisation.

### **Table 3: IFTA biomarkers**

Biomarkers significantly more recognized by IFTA patients than TG and Stable patients ( $p<0.05$ ). Names, accession number and references related to the 11 selected IFTA biomarkers are indicated. Biomarkers are ordered by cellular localisation.

### **Table 4: Stable biomarkers**

Biomarkers significantly more recognized by Sable patients than TG and IFTA patients ( $p<0.05$ ). Names, accession number and references related to the 10 selected Stable biomarkers are indicated. Biomarkers are ordered by cellular localisation.

**Table 1**

Group	Transplant	Interstitial fibrosis	Stable patients
	Glomerulopathy	Tubular atrophy	
	N=13	N=10	N=6
Sex ratio M/F	8 M /5 F	8 M /2 F	4 M /2 F
Recipient age	40.8 (23-65)	51.5 (33-69)	37 (25-51)
Months post transplant *	61.8 (9-180)	92.6 (11-250)	11.4 (11-16)
Serum creatinine ( $\mu$ mol/l)	201.7 +/- 60.4	180.2 +/- 163.1	97.5 +/- 24
Proteinuria (g/d)	2.26 +/- 1.46	1.65 +/- 1.65	0.2 +/- 0.11
Donor-specific antibodies	8/13	None	None

**Table 2**

Accession no	Protein name	Reference
<b>Nuclear</b>		
NM_004089.1	TSC22 domain family, member 3 (TSC22D3), transcript variant 2	(15)
BC000876.1	zinc finger protein 174 (ZNF174)	(16)
NM_002419.3	mitogen-activated protein kinase kinase kinase 11 (MAP3K11)	(18)
NM_004111.4	flap structure-specific endonuclease 1 (FEN1)	(23)
NM_032858.1	maelstrom homolog (Drosophila) (MAEL)	(60)
BC050401.1	family with sequence similarity 71, member D (FAM71D)	
<b>Membrane</b>		
NM_013333.2	epsin 1 (EPN1)	(20)
BC042428.1	collagen, type XXIII, alpha 1 (COL23A1)	(12)
NM_139161.2	crumbs homolog 3 (Drosophila) (CRB3), transcript variant 2	(24)
NM_014673.2	tetratricopeptide repeat domain 35 (TTC35)	(61)
<b>Cytoplasma and others</b>		
NM_133484.1	TRAF family member-associated NFKB activator (TANK)	(17)
NM_016417.2	glutaredoxin 5 (GLRX5)	(22)
BC030608.2	podocan (PODN)	(13)
NM_178582.1	histocompatibility (minor) 13 (HM13), transcript variant 4	(14)
NM_004734.1	doublecortin-like kinase 1 (DCLK1)	(62)
BC060760.1	GTPase, IMAP family member 6 (GIMAP6)	(63)
BC011585.1	protein kinase C, delta binding protein (PRKCDBP)	(19)
NM_020673.1	RAB22A, member RAS oncogene family (RAB22A)	(21)

**Table 3**

Accession no	Protein name	Reference
<b>Nuclear</b>		
NM_022443.2	myeloid leukemia factor 1 (MLF1)	(26)
BC020729.1	cyclin E2 (CCNE2)	(27)
<b>Membrane</b>		
BC021988.1	Nedd4 family interacting protein 2 (NDFIP2)	(29)
BC029267.1	mucin 20, cell surface associated (MUC20)	(32)
NM_016946.3	F11 receptor (F11R), transcript variant 1	(30)
NM_152296.3	ATPase, Na+/K+ transporting, alpha 3 polypeptide (ATP1A3)	(33)
<b>Others</b>		
BC006375.2	dual-specificity tyrosine-(Y)-phosphorylation regulated kinase 2 (DYRK2)	(64)
BC019823.1	sorting nexin family member 21 (SNX21)	(31)
BC029529.1	tubulin, beta 2C (TUBB2C)	(28)
BC040272.1	interleukin 16 (lymphocyte chemoattractant factor) (IL16)	(25)
NM_031473.2	intraflagellar transport 81 homolog (Chlamydomonas) (IFT81)	(65)

**Table 4**

Accession no	Protein name	Reference
<b>Nuclear</b>		
NM_015014.1	RNA binding motif protein 34 (RBM34)	(66)
BC010662.1	leucine rich repeat (in FLII) interacting protein 1 (LRRFIP1)	(38)
<b>Membrane</b>		
NM_006912.3	Ras-like without CAAX 1 (RIT1)	(37)
NM_139249.2	membrane-spanning 4-domains, subfamily A, member 6E (MS4A6E)	(67)
<b>Others</b>		
NM_005720.1	actin related protein 2/3 complex, subunit 1B, 41kDa (ARPC1B)	(35)
NM_000773.2	cytochrome P450, family 2, subfamily E, polypeptide 1 (CYP2E1)	(34)
BC001088.1	cell division cycle 20 homolog ( <i>S. cerevisiae</i> ) (CDC20)	(36)
NM_138415.1	PHD finger protein 21B (PHF21B)	(39)
BC057767.1	chromosome 20 open reading frame 132 (C20orf132)	(68)
NM_016951.2	chemokine-like factor (CKLF), transcript variant 1	(40)

## Résultats supplémentaires : Résultats préliminaires de validation des biomarqueurs

L'analyse des sérum de patients transplantés sur les puces à protéines a mis en évidence une série de biomarqueurs spécifiques de chacun des trois statuts du greffon, TG, FIAT et Stable. Toutefois, les Protoarray® entraînent un nombre élevé de résultats faux positifs, ce qui est dû au fait que plusieurs milliers de données sont étudiées sur une cohorte restreinte de patients. C'est pourquoi il est impératif de valider les résultats obtenus. Nous avons choisi plusieurs biomarqueurs issus des listes TG et IFTA, que nous avons analysé par la technique Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA).

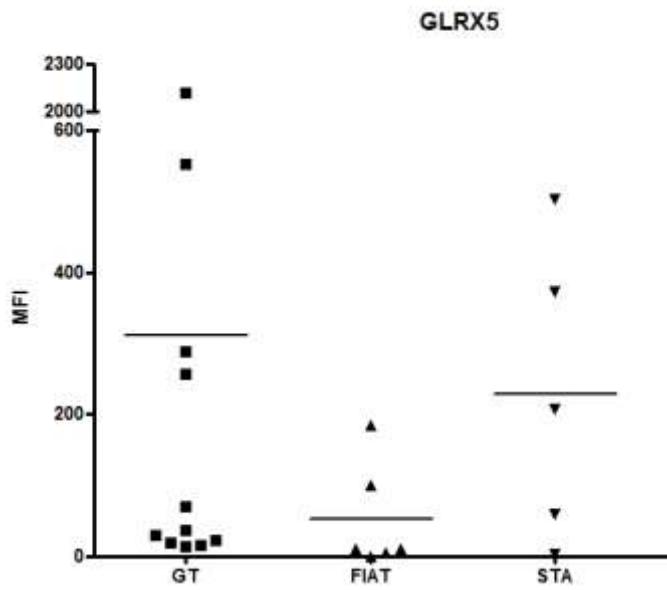
Pour ces essais de validation, nous avons acheté les protéines chez Invitrogen, de façon à travailler avec les mêmes protéines que celles qui sont présentes sur les puces. Les sérum utilisés sont également ceux qui ont servi lors de la recherche de biomarqueurs sur les Protoarray. Les plaques ont été coatées avec 0,1µg/ puits de protéine, saturées puis incubées avec 100µl de sérum dilué au 100<sup>ème</sup>. Après lavage, les plaques ont été incubées avec un anticorps anti-IgG humaine couplé à l'HRP.

La glutaredoxine 5 (GLRX5) est une des protéines qui a été reconnue spécifiquement par les anticorps des patients du groupe GT lors de l'étude par Protoarray. Les résultats obtenus en ELISA montrent une reconnaissance plus élevée dans le groupe de patient TG par rapport aux autres groupes, cependant cette différence n'est pas significative. En effet, les moyennes de signaux obtenus sont de  $310 \pm 187$  pour le groupe TG,  $51 \pm 30$  pour le groupe FIAT et  $229 \pm 94$  pour le groupe de patients stables (figure 1).

L'Interleukine 16 (IL-16) a été identifiée comme biomarqueur spécifique de la FIAT sur les puces à protéines. L'analyse par ELISA donne des résultats contraires. Les patients du groupe FIAT obtiennent ici la moyenne de fluorescence la plus faible ( $116 \pm 43$ ) comparé au groupe GT ( $195 \pm 96$ ) et Stables ( $234 \pm 133$ ) (figure 2).

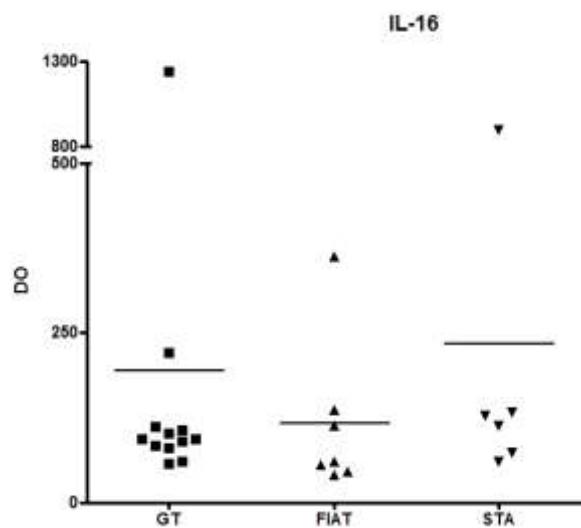
Nous n'avons pas réussi à valider nos biomarqueurs en utilisant un test ELISA, bien que nous ayons utilisé les mêmes protéines et les mêmes sérum. Les causes potentielles sont des différences dans les techniques, telles qu'une dilution des sérum au centième pour l'ELISA et au cinq centième pour les puces, une lecture en densité optique pour l'ELISA et en

fluorescence pour les Protoarray®. De plus, les sérum sont en présence de plusieurs milliers d'antigènes simultanément sur les puces tandis qu'ils ne sont en présence que d'un seul antigène en ELISA. Une autre explication possible est que nous avons utilisé les puces à Protéines afin de comparer trois groupes de patients. La majorité des études qui ont utilisé les puces ont comparé uniquement deux groupes, ce qui permet d'obtenir des résultats très significatifs. Certains de nos biomarqueurs ont atteint des différences significatives de l'ordre de  $p<10^{-6}$  entre deux groupes. L'ajout d'un troisième groupe a fortement réduit ces valeurs et nous avons placé notre seuil à  $p<0.05$ . La technique des puces à protéines est extrêmement sensible, et de ce fait des différences qui sont significatives sur les puces ne le sont peut-être plus en utilisant une technique moins sensible telle que l'ELISA. Notre objectif est de valider ces biomarqueurs sur des puces à protéines « dédiées ». Ces puces seront uniquement coatées avec nos biomarqueurs, ce qui permettra de tester plusieurs sérum sur une même puce, donc une cohorte plus importante de patients.



**Figure 1 : reconnaissance du biomarqueur GLRX5 par les sérums de patients GT, FIAT et Stables en test ELISA**

Les sérums de 11 patients GT, 6 patients FIAT et 5 patients Stables ont été dilués au 100<sup>ème</sup> et incubés dans des plaques coatées avec la protéine GLRX5 à 0,1µg par puits. Les résultats sont exprimés en densité optique. La moyenne de reconnaissance est plus élevée dans le groupe GT que dans les groupes FIAT et Stables mais n'atteint pas de différence significative.



**Figure 2 : reconnaissance du biomarqueur IL-16 par les sérums de patients GT, FIAT et Stables en test ELISA**

Les sérums de 12 patients GT, 7 patients FIAT et 6 patients Stables ont été dilués au 100<sup>ème</sup> et incubés dans des plaques coatées avec la protéine IL-16 à 0,1µg par puits. Les résultats sont exprimés en densité optique. La moyenne de reconnaissance est plus élevée dans le groupe Stable que dans les deux autres groupes. Ces résultats sont en contradiction avec ceux obtenus lors de la recherche de biomarqueurs par puces à protéines.

## Discussion

## **I- Rôle des sous-classes d'IgG anti-HLA de classe II dans le rejet chronique**

Le diagnostic actuel du rejet de greffe est basé sur une biopsie du greffon, qui permet de mettre en évidence des lésions histologiques caractéristiques du type de rejet en cours. Le suivi régulier des anticorps anti-HLA du patient transplanté renseigne également sur son statut humorale. Cependant, seules les IgG totales sont détectées en routine, alors que les quatre sous-types d'IgG ont des propriétés différentes, notamment leur capacité à activer le complément. Nous avons utilisé le kit de détection d'anticorps anti-HLA de classe II Single Antigen Beads (SABeads) et la technologie Luminex afin de mettre en évidence les quatre sous-types d'IgG dans le sérum de patients transplantés. Des études ont déjà porté sur la recherche de corrélation entre les sous-types d'IgG détectés avant transplantation et l'impact sur la survie du greffon (Arnold et al. 2008), ainsi que sur la relation entre la quantité de sous-types d'IgG fixé et la quantité de C3b observé (Kushihata et al. 2004), mais à notre connaissance aucune étude n'a été réalisée sur la corrélation entre le sous-type d'IgG DSA développé post-greffe et le type de lésions chroniques observées sur le greffon. Nous avons émis l'hypothèse que les profils de sous-type d'IgG anti-HLA donneur-spécifiques pourraient caractériser les différentes lésions chroniques développées par les patients.

Nous n'avons trouvé aucune corrélation entre le profil de sous-type d'IgG développés post-greffe par les patients et la sévérité des lésions histologiques observées sur les biopsies des greffons. En effet, aucune variation significative de taux d'un ou de plusieurs des sous-types d'IgG n'est observée parmi les patients, qu'ils aient des lésions histologiques de GT ou uniquement des lésions de FIAT sans évidence de C4d. Les moyennes de MFI des patients du groupe GT sont plus élevées que celles des patients FIAT pour chaque sous-type, mais aucune différence n'est significative. Le suivi des sous-types d'IgG DSA anti-HLA n'a donc aucune valeur prédictive du devenir du greffon.

Tous les patients inclus dans notre étude ont développé des IgG1 et IgG3 DSA, activateurs du complément. Cependant, aucun des patients du groupe FIAT ne présente de C4d sur les coupes histologiques de greffon. Il a été montré que le C4d fixé à la surface des cellules par des liaisons covalentes peut-être éliminé en quelques jours lorsque les anticorps anti-HLA disparaissent (Minami et al. 2006). De plus, le marquage C4d est intermittent sur les biopsies séquentielles de patients présentant une GT, phénomène potentiellement dû à des variations de taux d'anticorps anti-HLA (Wavamunno et al. 2007). Il est possible que certains

des patients aient eu un taux suffisamment faible de DSA quelques temps avant le sérum que nous avons sélectionné, et de ce fait ne présentent plus de C4d le jour de la biopsie, malgré des DSA à nouveau détectables. Une différence significative que nous avons observée concerne le nombre de billes reconnues par les anticorps des patients. Ainsi, lorsque l'on ne considère que les MFI les plus élevées ( $> 1000$  MFI) afin de ne conserver que les anticorps les plus relevant, les DSA activateurs du complément (IgG1 et IgG3) reconnaissent un nombre plus élevé de molécules HLA chez les patients GT que chez les patients FIAT ( $p=0.0448$ ). Ce facteur pourrait participer à la différence de marquage de C4d entre les patients ayant une GT et ceux ne présentant que des lésions de FIAT. À défaut d'un titre plus élevé d'anticorps anti-HLA, les patients GT semblent développer une réponse plus «variée» que les patients du groupe FIAT. De plus, il a été montré que ni le sous-type d'IgG DSA, ni leur titre ne corrèle fortement avec la présence de C3b, autre produit issu de l'activation de la voie du complément. En revanche, la présence simultanée de deux anticorps sur des épitopes différents de la même molécule HLA induit significativement un dépôt de C3b (Kushihata et al. 2004). Cette observation pourrait également expliquer que la faible différence des moyennes de MFI mais le nombre plus élevé d'antigènes reconnus par les IgG1 et IgG3 implique un panel plus étendu de DSA activateurs du complément chez les patients GT que les patients FIAT, qui soit suffisant pour permettre la fixation de plusieurs anticorps sur des épitopes variés des mêmes molécules HLA et engendrer ainsi des dépôts de C4d.

L'IgG4 est une immunoglobuline particulière. Elle ne représente que 5% des IgG totales humaines (Salfeld 2007) et n'a pas la capacité d'activer le complément. Cette immunoglobuline pourrait donc occuper les cibles HLA sans déclencher de cytotoxicité dépendante du complément, tout en empêchant la fixation d'immunoglobulines IgG1 et IgG3. Elle pourrait alors atténuer la sévérité des lésions humorales du transplant. Des IgG4 DSA n'ont été identifiées que chez 5 patients dans notre étude, dont 2 ont une réponse majoritairement IgG4. Toutefois, 4 de ces patients, dont les deux ayant une majorité d'IgG4 et IgG2, ont développé une GT, avec dépôts de C4d. Ces résultats démontrent donc que l'IgG4, même lorsqu'elle est dominante, n'atténue pas la sévérité des lésions histologiques. Deux hypothèses découlent de cette observation. Soit le taux d'IgG4 n'a pas permis de masquer l'ensemble des antigènes, et suffisamment d'IgG1 ont pu se fixer pour activer le complément, soit la fixation simultanée des deux sous-types accroît la fixation du complément.

Le sous-type d'IgG le plus représenté dans le sérum humain est l'IgG1, c'est également le sous-type développé le plus fréquemment par les patients de cette étude, aux MFI

généralement les plus élevées. L'IgG1 est une immunoglobuline capable de fixer et d'activer le complément. Nous avons analysé le sérum de deux patients présentant une réponse humorale restreinte au sous-type IgG1, à des MFI élevées, mais qui ne reconnaissent qu'une ou deux billes du kit. Bien qu'activant le complément et étant présentes à des MFI élevées, ces IgG1 n'ont pas entraîné de dysfonction rénale chez les deux patients, qui présentent une créatinémie stable et une protéinurie correcte sur l'ensemble des sérum testés lors de cette étude. Il semble donc que la présence d'IgG1, lorsqu'elle est le seul sous-type développé, et que peu de molécules HLA sont ciblées, ne soit pas délétère pour le greffon. Des patients transplantés ayant une fonction rénale normale malgré la présence d'anticorps donneur-spécifiques ont déjà été observés, principalement lors de greffe ABO-incompatibles. Par la suite, des modèles expérimentaux ont mis en évidence des modifications transcriptionnelles au sein des greffons, visant à mettre en place un mécanisme de résistance par la production d'hème oxygénase ou l'expression de gènes anti-apoptotiques (Bach et al. 1997), (Hancock et al. 1998). Les 2 patients pourraient donc avoir développé une forme d'accommodation à leur transplant. Ce résultat est toutefois à interpréter avec précaution, car il n'est basé que sur deux cas. De plus, les patients ne présentant pas de signe clinique de rejet, aucune biopsie n'a été réalisée, et il n'est donc pas possible d'affirmer qu'aucune lésion infraclinique n'est présente sur les greffons.

Notre étude présente un certain nombre de limitations, en partie liées à l'utilisation du kit SABeads et de la technologie Luminex. L'avantage de cette technologie, outre la possibilité de détecter à la fois les anticorps activant et n'activant pas le complément, est de permettre une détermination précise des DSA (Tait et al. 2009), y compris des spécificités HLA-Cw et HLA-DP. En effet, les billes du kit portent chacune un antigène défini (El-Awar et al. 2005), dont plusieurs variant existent pour certaines spécificités en fonction des associations de chaînes  $\alpha$  et  $\beta$  pour la classe II. Ce niveau de précision nécessite de connaître le typage allélique du donneur, ainsi que celui du receveur afin de déterminer l'antigène incompatible, cependant ces informations ne sont pas systématiquement disponibles. De plus, les greffes les plus anciennes comprennent souvent uniquement des informations sur les spécificités HLA-A et HLA-B pour la classe I, HLA-DR et parfois HLA-DQ pour la classe II. Lorsque la spécificité HLA-DQ n'est pas connue, il est souvent possible de la déduire. En effet, la proximité des gènes codant pour les molécules HLA-DQ et HLA-DR sur le bras court du chromosome 6, et leurs déséquilibres de liaison, permettent de prédire la composition de l'haplotype dans la population caucasienne (Klitz et al. 2003). Il est alors possible de définir

les gènes DQA et DQB (chaînes  $\alpha$  et  $\beta$  du HLA-DQ) à partir du gène DRB1 (HLA-DR). Nous avons dû recourir à cette solution pour certains patients de notre étude.

De plus, une étude récente a mis en évidence plusieurs points pouvant induire des biais d'analyse lors de l'utilisation des kits SABeads en Luminex. Tout d'abord, la présence d'une IgM dirigée contre une spécificité HLA perturbe la fixation de l'IgG correspondante à l'antigène. Nous n'avons pas traité nos sérums au DTT et il est possible que nous n'ayons pas mis en évidence l'ensemble des DSA. Toutefois, les IgM anti-HLA sont rares et le risque que cela se soit produit est faible. Ensuite, un sérum dilué peut engendrer un signal plus élevé qu'un sérum pur. Nous n'avons pas dilué nos sérums avant de les utiliser, car le protocole de suivi régulier des anticorps anti-HLA chez les patients transplantés ne préconise pas de dilution de sérum. Les auteurs ont également constaté des variations de densité d'antigènes sur les SABeads, problème qu'ils ont résolu en normalisant les signaux des sérums par rapport au signal engendré par un anticorps anti-HLA de classe I. Cette solution n'est pas envisageable sur des antigènes de classe II car aucun anticorps ne couvre actuellement l'ensemble des antigènes HLA de classe II présents dans le kit. Enfin, l'étude montre que le signal obtenu par un sérum peut être supérieur au signal obtenu avec l'anticorps anti-HLA de classe I, qui devrait pourtant saturer les antigènes des billes. Ce phénomène peut s'expliquer par la fixation de plusieurs anticorps du sérum sur des épitopes différents d'un même antigène (Kosmoliaptsis et al. 2009).

La technologie Luminex détecte des DSA qui ne sont pas vus en cross-match LCT car elle permet la détection des anticorps n'activant pas le complément, les IgG2 et IgG4 (Lobashevsky et al. 2010), mais également du fait de sa sensibilité très élevée. La question qui se pose alors est la relevance des anticorps observés et le choix du seuil de positivité à fixer. Il a en effet été démontré qu'en dessous d'un certain seuil, les anticorps détectés ne sont pas relevant et les résultats sont peu reproductifs (Aubert et al. 2009),(Lefaucher et al. 2010),(Morales-Buenrostro et al. 2008). Nous avons choisi un seuil de positivité équivalent à trois fois le signal obtenu en utilisant un sérum contrôle négatif (dépourvu d'anticorps anti-HLA). Ce seuil se situe aux alentours de 100 MFI pour chaque bille, mais les études citées précédemment semblent indiquer qu'au dessous d'environ 500 MFI, les anticorps détectés ne sont pas relevant. Un nombre plus important d'anticorps est donc détecté depuis l'utilisation du Luminex, toutefois des études ont mis en évidence des antigènes dénaturés, ou modifiés, sur les billes. Ainsi, les billes portant les antigènes HLA de classe I portent à la fois des molécules HL A de classe I complètes, et des molécules constituées de la chaîne lourde  $\alpha$  dépourvue de  $\beta 2$ -microglobuline (Cai et al. 2008). Les patients présentent des

anticorps contre les deux formes d'antigènes, mais seuls les anticorps contre la forme complète des molécules HLA de classe I corrèlent avec une baisse de survie du greffon (Cai et al. 2009). L'observation d'antigènes dénaturés est plus complexe pour les molécules HLA de classe II car elles ne sont pas associées à la  $\beta$ 2-microglobuline, cependant la fixation des antigènes aux billes doit également dénaturer une petite fraction de ces molécules. Il est donc possible que le nombre d'anticorps détectés par Luminex surestime le nombre de DSA circulants réellement « actifs » chez les patients transplantés.

Pour résumer cette première partie, l'étude de sérum de patients transplants par SABeads en utilisant la technologie Luminex a montré que les sous-classes d'IgG ne corrèlent pas avec la sévérité des lésions histologiques. De plus, l'IgG4 ne corrèle pas avec des lésions atténuerées par rapport à l'IgG1. Une différence est toutefois observée concernant le panel de molécules HLA ciblées par les IgG activant le complément. L'étude des sous-types d'IgG développés post-transplantation est donc peu informative et ne permet pas d'expliquer les différentes lésions chroniques du transplant. D'autres facteurs doivent être pris en compte, notamment la présence d'anticorps DSA pré-greffe, qui a un impact négatif sur la survie du greffon et augmente le risque de survenue d'une AMR, malgré un cross-match négatif le jour de la greffe. De plus, il a été montré que les MFI du pic historique de DSA corrèlent mieux avec une diminution de la survie du greffon que l'analyse des sérum au jour de la greffe (Lefaucheur et al. 2010). Les anticorps ont également la capacité de provoquer la lyse de leur cellule cible sans passer par la voie du complément. La fixation du fragment constant des immunoglobulines au récepteur Fc $\gamma$ RIIA permet d'induire l'ADCC (Antibody-Dependant Cellular Cytotoxicity) (Cornell et al. 2008).

## **II- Recherche de biomarqueurs pour le diagnostic des différentes formes du rejet chronique**

Une littérature abondante décrit la présence d'anticorps auto- ou allo-immuns dirigés contre des antigènes qui ne sont pas toujours des molécules HLA, dans les sérum de patients transplantés ou d'individus sains. Ainsi, des anticorps dirigés contre des antigènes HLA qui sont rares dans la population ont été observés chez des individus sains, de sexe masculin et jamais transfusés. Ces anticorps atteignent des MFI élevées, au dessus de 1000 MFI sur des SABeads, sont dirigés contre des molécules HLA de classe I, de classe II ou des deux classes simultanément et perdurent dans le temps (Morales-Buenrostro et al. 2008). Des anticorps

dirigés contre des composants de la membrane basale glomérulaire ont également été observés chez des individus sains. Ces mêmes anticorps peuvent induire un syndrome de Goodpasture chez des patients, mais sont alors principalement des IgG1 et IgG4. Les individus sains ne développent que des sous-types non activateurs du complément (IgG2 et IgG4), à un titre plus faible que les patients développant un syndrome de Goodpasture (Cui et al. 2006). Chez le rat, des anticorps dirigés contre des antigènes de la membrane basale glomérulaire et tubulaire, de la lignée du donneur uniquement, ont été détectés après transplantation rénale. Ces anticorps ne sont observés que chez les rats présentant des lésions chroniques de glomérulopathie (de Heer et al. 1994). En transplantation cardiaque, des anticorps anti-myosine cardiaque sont développés par des souris après greffe allogénique cardiaque, mais pas après greffe allogénique de peau ou greffe syngénique cardiaque. Les anticorps développés sont donc spécifique du tissu greffé et dépendant d'une réaction alloimmune vis-à-vis de ce tissus (Fedoseyeva et al. 1999). Une étude a également montré que l'administration d'anticorps anti-HLA de classe I sur des poumons naïfs de souris induit des signes cliniques de rejet pulmonaire, ainsi que le développement d'auto-anticorps anti-K $\alpha$ 1 tubuline et collagène V (Fukami et al. 2009). Dragun établit en 2008 une liste des anticorps dirigés contre des antigènes non HLA observés après transplantation d'organe (Dragun 2008): anticorps anti-cellules endothéliales (AECA) (Rose 2004), ces anticorps sont également présents avant la greffe chez 47% de patients immunisés et 16% de patients non immunisés d'une cohorte de 57 patients et ne corrèle pas avec la survenue de rejets aigus ou avec une baisse de survie du greffon. Ils entraînent néanmoins une diminution de la viabilité cellulaire *in vitro* en induisant l'apoptose des cellules endothéliales (Le Bas-Bernardet et al. 2003); anticorps anti-MICA et MICB (Sumitran-Karuppan et al. 1997); anticorps anti-récepteur de type 1 de l'angiotensine (Dragun et al. 2005); anticorps anti-vimentine (Jurcevic et al. 2001); anticorps anti-molécule 1 d'adhésion intracellulaire (ICAM-1) (Lawson et al. 2005) et enfin, anticorps anti-protéoglycannes à héparanes sulfates, Agrin (Joosten et al. 2005) chez l'homme et Perlecan chez le rat (Joosten et al. 2002).

Ces études démontrent ainsi que des anticorps dirigés contre des antigènes allo- ou auto-immuns sont présents chez des individus sains, mais également suite à une transplantation où ils sont capables de différencier 2 états, pathologiques ou non. C'est pourquoi nous avons développé un second axe d'étude, que nous avons consacré à la recherche de biomarqueurs antigéniques reconnus par les anticorps des patients transplantés.

Notre étude est parmi les premières à avoir utilisé les puces à protéines pour la détection de biomarqueurs en transplantation rénale. Les puces à protéines sont une nouvelle

technologie permettant d'identifier les biomarqueurs antigéniques reconnus par les anticorps dans le sérum des patients. Les antigènes reconnus peuvent être des auto- ou des allo-anticorps. Un signal élevé sur les puces implique un taux élevé d'anticorps et donc un biomarqueur potentiel de la pathologie étudiée. Les puces à protéines ont été utilisées avec succès afin de déterminer des profils spécifiques d'anticorps dans le sérum de patients souffrant de différentes pathologies telles que des cancers (Hudson et al. 2007), (Nam et al. 2003), ou des maladies autoimmunes (Horn et al. 2006), (Lalive et al. 2006), (Auger et al. 2009). Comparé à d'autres outils de protéomique utilisés dans la recherche de biomarqueur, tels que la spectrométrie de masse, les puces à protéines ont l'avantage d'identifier les antigènes reconnus, et offrent ainsi des pistes pour la compréhension des phénomènes physiopathologiques causant les lésions.

Les puces à protéines nous ont permis d'identifier des biomarqueurs spécifiques de chacun des trois groupes de patients que nous avons sélectionnés : les patients ayant développé une GT, les patients présentant une FIAT sans étiologie spécifique, et les patients stables. Un grand nombre de ces biomarqueurs sont impliqués dans des voies se rapportant à l'apoptose, suggérant qu'un tel phénomène est courant chez les patients transplantés. Il est en effet possible que des lésions inhérentes à la transplantation provoquent l'apoptose de cellules endothéliales du transplant, qui relarguent alors leur contenu intracellulaire et induisent la production d'anticorps contre ces nouveaux antigènes.

Ainsi, l'utilisation des puces à protéines nous a permis de mettre en évidence 18 biomarqueurs spécifiques de la glomérulopathie du transplant, parmi lesquels deux sont particulièrement intéressants. Le Collagène XXIII est une protéine transmembranaire dont la fonction est inconnue dans le rein. Il a cependant été montré que cette protéine colocalise avec la Laminine dans d'autres tissus (Koch et al. 2006) et interagit donc probablement avec la membrane basale. Le Podocan est produit et exprimé par des tissus rénaux, notamment les podocytes, les cellules endothéliales et la membrane basale glomérulaire. La présence d'anticorps dirigés contre ces deux protéines serait alors cohérente avec les atteintes glomérulaires observées dans la GT.

Les onze biomarqueurs spécifiques de la FIAT suggèrent des lésions des cellules tubulaires et de l'inflammation. Ils comprennent en effet plusieurs canaux, dont la Na-K ATPase impliquée dans la réabsorption du NaCl, et de l'IL-16, une chimiokine recrutant les leukocytes sur les sites d'inflammation.

Dix biomarqueurs ont également été identifiés dans le groupe de patients stables. La raison de la présence d'anticorps chez des patients dont les transplants sont fonctionnels n'est pas claire. Toutefois, des autoanticorps sont parfois retrouvés chez des individus sains, et la technique des Protoarrays étant sensible, il est possible que les anticorps observés aient un titre trop faible pour engendrer des lésions au greffon. Il se peut également que ces anticorps soient des épiphénomènes.

De manière surprenante, les listes de protéines obtenues lors de cette étude sont différentes de celles obtenues au cours d'une étude récente ayant porté sur 18 patients pédiatriques transplantés rénaux (Li et al. 2009). Cette étude fut la première à utiliser les puces à protéines chez des patients transplantés et a mis en évidence des protéines majoritairement localisées dans le pelvis et le cortex rénal dont la présence est difficile à interpréter car les patients ont été sélectionnés indépendamment du statut de leur greffon. De façon similaire, un papier récent a utilisé la même technologie dans le rejet aigu rénal chez des patients pédiatriques et montre des anticorps anti-Protéine kinase C $\zeta$  (Sutherland et al. 2009).

Notre étude connaît plusieurs limitations. La cohorte de patients est petite, et hétérogène du point de vue des traitements immunosupresseurs utilisés et du délai entre la transplantation et le prélèvement du sérum utilisé pour l'étude, correspondant au jour de la biopsie. Les patients stables ont été sélectionnés sur la base d'une biopsie systématique à un an post-greffe afin de s'assurer de l'absence de toute lésion infraclinique de GT ou de FIAT. Chez les patients GT et FIAT, le délai moyen post-greffe n'est pas significativement différent, ce qui suppose qu'aucun biais conséquent à l'âge de la greffe n'est introduit entre les deux groupes.

La technique elle-même induit des limitations. En effet, le coût important de la technologie limite le nombre de patients inclus. Un petit nombre de patients testés sur un nombre très élevé de cibles complique l'analyse statistique et augmente considérablement le risque de résultats faux-positifs. Nous avons minimisé ce risque autant que possible en ne conservant que les biomarqueurs dont la p-value est la plus basse. Il a également été montré que lorsque des sérum de patients sont analysés par une technique de puces à protéines, des biomarqueurs différencient les groupes de patients, mais ne sont pas reconnus par plusieurs patients d'un même groupe (Porcheray et al. 2010). A l'inverse de cette étude, nos biomarqueurs sont en majorité reconnus par au moins la moitié des patients au sein du groupe.

Nous avons donc identifié, par la technique des Protoarrays®, des biomarqueurs de GT et de FIAT tels qu'ils sont décrits dans la classification de Banff, et du transplant stable. Ces biomarqueurs doivent être validés sur une cohorte de patients plus importante, pour qui plusieurs sérums seront prélevés afin d'évaluer les éventuelles changements de profils en fonction du stade de la pathologie. Ces biomarqueurs pourront par la suite être utilisés comme outil diagnostic permettant de différencier, de façon non invasive et à un stade précoce, les différentes atteintes rénales, de façon à mettre en place un traitement adapté à un stade où les lésions sont accessibles.

## **Conclusions - Perspectives**

Mes travaux de thèse ont porté sur l'étude des anticorps développés par les patients transplantés. Au cours de ces trois années, j'ai adapté la technologie Luminex afin de détecter les sous-classes d'IgG chez des patients ayant développé des DSA anti-HLA. Les résultats obtenus indiquent que les lésions chroniques des greffons ne corrèlent ni avec la fréquence des sous-classes d'IgG développées, ni avec leurs titres respectifs. Le nombre d'antigènes reconnus par les IgG1 et IgG3 activatrices du complément est cependant significativement plus élevé chez les patients ayant développé une Glomérulopathie du Transplant que chez les patients ne présentant que des signes histologiques de Fibrose Interstitielle et Atrophie Tubulaire. Les résultats mettent également en évidence des réponses majoritairement non activatrices du complément (IgG2 et IgG4) malgré la présence de lésions chroniques humorales.

Nous nous sommes aussi intéressés aux mécanismes auto-immuns présents dans le rejet chronique. L'équipe de Leiden a mis en évidence, dans une série d'expériences réalisées chez l'animal et chez l'homme, des anticorps anti-protéoglycannes à héparanes sulfates dans la glomérulopathie du transplant (Joosten 1 et 2). A la recherche d'autres cibles pour des autoanticorps, pouvant être pathogènes ou de simples marqueurs diagnostiques, nous avons utilisé une technique nouvelle de protéomique. Nous avons ainsi analysé par Protoarray® de sérum de patients présentant une GT, de patients présentant une FIAT sans étiologie spécifique et de patients transplantés stables et déterminé des biomarqueurs de chacun de ces trois statuts du transplant. Ce travail a bénéficié d'un financement DHOS-INSERM.

La suite du projet consiste à valider les biomarqueurs que nous avons obtenus par puces à protéines, suivant deux axes. La première partie sera consacrée à la fabrication des puces dédiées : production en cellules d'insecte, puis purification et fixation sur des puces dédiées des biomarqueurs que nous avons mis en évidence. Les puces généralistes fournies par Invitrogen ne permettent de tester qu'un sérum par puce. Les puces dédiés ne contiennent que les biomarqueurs d'intérêt, ce qui permet de tester plusieurs sérum par puce. A coût équivalent, nous prévoyons de valider nos biomarqueurs sur une cohorte comprenant 50 patients dont la GT aura été prouvée par biopsie, 50 patients dont la FIAT aura été prouvée par biopsie, 10 patients présentant un syndrome néphrotique dont l'étiologie n'est pas une GT, et 120 patients ayant eu une biopsie systématique à un an, parmi lesquels 50 auront une biopsie normale, 20 présenteront une GT et 50 une FIAT. Plusieurs sérum seront testé pour chaque patient, depuis le jour de la greffe jusqu'à la biopsie, afin de suivre l'évolution des biomarqueurs dans le temps.

La seconde partie du projet visera à détecter ces biomarqueurs en ELISA afin de procéder à une validation en utilisant une autre technologie et qui sera plus adaptée à une utilisation en routine. Ce projet, dénommé projet ANTIGA, a obtenu en 2009 un financement ANR Emergence-BIO pour une période de deux ans.

La première étape est en cours. Nous avons acheté les baculovirus des biomarqueurs d'intérêt chez Invitrogen, et nous avons commencé la transfections des cellules d'insecte Sf9 par les baculovirus. Nous avons rencontré quelques difficultés au début de cette étude. Les problèmes sont actuellement résolus. Des tests de production à petite échelle ont été réalisés. La production à grande échelle est en cours. L'obtention des protéines purifiées nous permettra de fabriquer les puces dédiées nécessaires à la validation des biomarqueurs.

Au terme de l'étude, les biomarqueurs pourront constituer un test diagnostic, non invasif, permettant d'identifier précocement les lésions de GA et de FIAT. Une détection précoce offre l'avantage de mettre en place un traitement à un stade où les lésions sont encore accessibles, ce qui n'est pas le cas aujourd'hui. De plus, un tel outil permettrait une évaluation simple et précise de nouvelles molécules et stratégies thérapeutiques, renouvelable sans risque pour un suivi régulier et complet.

## **Annexes**

Banff 1991		Banff 1997		Banff 2005		Banff 2007 et 2009			
Normal		Normal		Normal		normal			
Rejet hyperaigu		AMR, due en partie aux HLA DSA.	A-immédiat (hyperaigu)	AMR	AMR aigu	I-C4d+, inflammation minimale III-v3 artériel, C4d+	Changements à médiation humorale	Dépôts de C4d sans évidence morphologique de rejet actif	
			B-retardé		AMR chronique actif	C4d+ et/ou multilamellation des capillaires péri-tubulaires et/ou PIAT et/ou épaissement intimal des		C4d+, HLA DSA I-Inflammation minimale de type nécrose tubulaire aiguë II-inflammation capillaire et/ou glomérulaire et/ou thromboses III-v3 artériel	
Changement borderline: rejet aigu très léger		Changement borderline: suspicion de rejet aigu	tubulite modérée infiltration interstitielle de cellules mononucléées	Changement borderline: suspicion de TCMR aigu			AMR chronique actif	C4d+, HLA DSA épaissement de la membrane basale glomérulaire et/ou multilamellation des capillaires péri-tubulaires et/ou PIAT et/ou épaissement intimal des artères	
Rejet aigu	I-léger, infiltration interstitielle significative et tubulite modérée	Rejet actif / aigu	IA-infiltration interstitielle significative et tubulite modérée IB-infiltration interstitielle significative et tubulite sévère IIA-artérite intime légère à modérée IIB-artérite intime sévère III-aigu, artérite intime sévère et/ou artérite transmurale avec nécrose du muscle lisse	TCMR	TCMR aigu	IA-infiltration interstitielle significative et tubulite modérée IB-infiltration interstitielle significative et tubulite sévère IIA-artérite intime légère à modérée IIB-artérite intime sévère III-artérite transmurale et/ou nécrose du muscle lisse avec inflammation lymphocytaire	TCMR	Changement borderline: suspicion de TCMR aigu	tubulite avec infiltration interstitielle mineure ou infiltration interstitielle avec tubulite modérée
	II-modéré, infiltration interstitielle significative avec tubulite sévère et artérite intime légère à modérée		TCMR chronique actif		artériopathie chronique d'allo greffe	IA-infiltration interstitielle significative et tubulite modérée IB-infiltration interstitielle significative et tubulite sévère IIA-artérite intime légère à modérée IIB-artérite intime sévère III-artérite transmurale et/ou nécrose du muscle lisse avec inflammation lymphocytaire			
	III-aigu, artérite intime sévère et/ou artérite transmurale avec nécrose du muscle lisse					artériopathie chronique d'allo greffe			
CAN	I-CAN légère, PIAT légère	CAN schérosante	IA-PIAT légère sans changement suggérant un rejet chronique IB-PIAT légère avec changement suggérant un rejet chronique IIA-PIAT modérée sans changement suggérant un rejet chronique IIB-PIAT modérée avec changement suggérant un rejet chronique IIIa-PIAT sévère sans changement suggérant un rejet chronique IIIb-PIAT sévère avec changement suggérant un rejet chronique	PIAT		I-légère: <25% de l'aire corticale II-modérée: 26-50% de l'aire corticale III-sévère: >50% de l'aire corticale	PIAT	I-légère: <25% de l'aire corticale II-modérée: 26-50% de l'aire corticale III-sévère: >50% de l'aire corticale	
	II-CAN modérée, PIAT modérée								
	III-CAN sévère, PIAT sévère et perte tubulaire								
autre	changement sans évidence de rejet aigu et/ou chronique	Autre	changement sans évidence de rejet aigu et/ou chronique	Autre		changement sans évidence de rejet aigu et/ou chronique	Autre	changement sans évidence de rejet aigu et/ou chronique	

Annexe 1 : Evolution de la classification de Banff entre 1991 et 2009

## Biomarkers for the Diagnosis of Renal Allograft and Kidney Status

### Related Applications

The present application claims priority to European Patent Application No. EP 08 305 988.1 filed on December 19, 2008. The European patent application is incorporated herein by reference in its entirety.

### Background of the Invention

Although end-stage disease patients can be treated through other renal replacement therapies such as hemodialysis and peritoneal dialysis, kidney transplantation is generally accepted as the best treatment because it increases patients survival, improves quality of life and presents cost effectiveness. Renal transplantation is by far the most frequently carried out transplantation globally. The World Health Organization estimates that about 66,000 kidney transplants (from living and deceased donors) are performed annually compared to 21,000 liver transplants and 6,000 heart transplants. Renal transplantation is also the most successful and therapeutically advanced of all organ transplant procedures. Recent reports of patient survival in renal transplantation show a 91.3% 1-year and 69.6% 5-year survival for recipients of cadaveric grafts, and a 97.3% 1-year and 80.3% 5-year survival for those receiving living donor transplants (2007 Annual Report of the Scientific Registry of Transplant Recipients and U.S. Organ Procurement and Transplantation Network: Transplant Data 1997-2006). In France, patient survival in renal transplantation shows a 79.1% at 5-years and 62.4% at 10-year survival for recipients of cadaveric grafts, and 89.6% at 5-year and 76.7% at 10-year for those receiving a living donor transplant (2007 Report of "Agence de Biomédecine": [www.agence-biomedicine.fr](http://www.agence-biomedicine.fr)). With improved immunosuppression and early transplant survival, chronic allograft rejection has become the most prevalent cause of kidney transplant failure. Up to 40% of grafts develop progressive dysfunction after the initial few post-transplant months and ultimately fail within a decade, despite the use of immunosuppressive drugs in doses sufficient to prevent acute rejection.

Several pathophysiological processes contribute to chronic renal transplant injury, including renal transplant lomerulopathy (TG) and interstitial fibrosis and tubular atrophy (IFTA) according to the newly revised Banff classification system (Solez *et al.*, Am. J.

Transplant, 2007, 7: 518-526). Renal transplant Iomerulopathy is associated with graft dysfunction, hypertension, proteinuria and shortened graft survival. It is a unique pathologic and pathogenic entity distinct from other forms of chronic allograft injury (Suri *et al.*, Am. J. Kidney Dis., 2000, 35: 674-680). Transplant Iomerulopathy is characterized by duplication of the glomerular basement membrane, mesangial interposition, and electron lucent widening of the sub-endothelial space with accumulation of flocculent material. The pathogenesis of transplant Iomerulopathy is unclear, but, increasingly, investigators hypothesize immune-mediated mechanisms with a strong emphasis on humoral immunity as defined by detection of donor-specific anti-HLA antibodies in patients' serum (Hourmant *et al.*, J. Am. Soc. Nephrol., 2005, 16: 2804-2812) and/or positive C4d staining of the allograft.

The chronic allograft nephropathy (CAN) encompasses all late scarring of the graft due to immunologic and non-immunologic injury. The last Banff classification eliminated the CAN denomination and replaced it with Interstitial Fibrosis and Tubular Atrophy (IFTA). The etiologies of this disease are multiple including chronic hypertension, drug toxicity, viral infection, and chronic obstruction (Solez *et al.*, Am. J. Transplantation, 2007, 7: 518-526).

Biopsies have revealed that renal transplant Iomerulopathy and IFTA can develop during the first few months after transplantation (Wavamunno *et al.*, Am. J. Transplantation, 2007, 7: 2757-2768). However, currently available diagnostic methods often fail to detect chronic rejection until late stages of progression, when lesions and damage to the transplant have already occurred. Clinical manifestations such as creatinine and altered resistance indexes on Doppler ultrasonography are not specific. At present, biopsy of the renal allograft is considered as the standard for the diagnosis of chronic rejection. However, percutaneous renal biopsy is a costly, invasive procedure, which carries the risk of procedural complications including allograft thrombosis, sepsis, hematuria, and anuria. Consequently, serial renal biopsies are avoided, which limits the use of this procedure in the follow-up of the disease activity, treatment response and recurrence. This situation explains the need for a non-invasive diagnostic tool that can be used to monitor renal allograft, even before graft dysfunction occurs, and to improve treatment success through early and reliable detection.

Several studies have been undertaken with the goal of identifying biomarkers of chronic renal transplant rejection. Gene expression profiles of chronically rejected renal transplants (Donauer *et al.*, Transplantation, 2003, 76: 539-547; Sarwal, New Engl. J. Medicine, 2003, 349: 125-138), operationally tolerant kidney graft recipients and patients

with chronic rejection (WO 2005/070086); kidney biopsies and peripheral blood lymphocytes (Flechner *et al.*, Am. J. Transplantation, 2004, 4: 1475-1489) have been determined using microarrays. A study investigated kidney biopsies performed 6 months post transplant using an Affymetrix GeneChip and identified 10 genes for which expression correlated with the risk of developing chronic rejection defined by biopsy at 12 months post transplant (Scherer *et al.*, Transplantation, 2003, 75: 1323-1330). Recently, efforts are focussing on the characterization of renal rejection by urinary proteomic analysis (Clarke *et al.*, Annals of Surg., 2003, 237: 660-665; WO 2004/030521; Schaub *et al.*, J. Am. Soc. Nephrol., 2004, 15: 219-227; Reichelt *et al.*, Urology, 2006, 67: 472-475; O'Riordan *et al.*, Am. J. Transplant., 2007, 7: 930-940, Thongboonkerd, Proteomics Clin. Appl., 2008, 2: 1413-1421).

## **Summary of the Invention**

The present invention relates to improved systems and strategies for the diagnosis of chronic renal transplant rejection. In particular, the invention provides the identity of proteins that reflect clinically relevant processes in dialysis patients with end-stage kidney disorder and in renal transplant patients. More specifically, the invention provides biomarkers that can be used for detecting the presence of antibodies that are selectively indicative of end-stage kidney disorder, renal transplant lomerulopathy, interstitial fibrosis and tubular atrophy (IFTA), and stable renal transplant, in *in vitro* biological samples (in particular blood samples) obtained from patients. Compared to existing methods of diagnosis, the inventive methods are non-invasive, and the protein profiles disclosed herein constitute a more robust signature of each of the different pathologies, and provide a more reliable basis for the selection and monitoring of appropriate therapeutic regimens.

More specifically, in one aspect, the present invention provides a set of biomarkers indicative of kidney status consisting of RAB20, OAS2, IL1RL1(3), GLRA2, SMAD3, ING4(2), CCL19, CENTD2, ECE1, LGALS3, analogs thereof and antibody-binding fragments thereof; a set of biomarkers indicative of stable renal transplant consisting of ARPC1B, CYP2E1, CDC20, RIT1, PHF21B, RBM34, MS4A6E, C20orf132, LRRKIP1, CKLF(1), analogs thereof and antibody-binding fragments thereof, a set of biomarkers indicative of renal transplant lomerulopathy consisting of PODN, HM13(4), TSC22D3(2), EPN1, COL23A1, GIMAP6, ZNF174, MAP3K11, CRB3(2), PRKCDP, DCLK1, FEN1, TANK(2), GLRX5, RAB22A, MAEL, FAM71D, TTC35, analogs thereof, and antibody-binding fragments thereof; and a set of biomarkers indicative of IFTA

consisting of IL16, MLF1, IFT81(2), DYRK2, NDFIP2, CCNE2, SNX21, TUBB2C, MUC20, ATP1A3, F11R(1), analogs thereof and antibody-binding fragments thereof.

The present invention also provides for the use of at least one of these biomarkers, preferably a plurality of these biomarkers, for the *in vitro* determination of kidney status or renal transplant status in a subject.

In certain embodiments, the biomarkers are provided immobilized on a solid carrier or support, such as beads or array.

Accordingly, in a related aspect, the present invention provides an array for the *in vitro* determination of kidney status or renal transplant status in a subject, the array essentially having, attached to its surface, a plurality of biomarkers selected from those described herein.

In another aspect, the present invention provides a method for diagnosing or determining kidney status or renal transplant status in a subject, the method comprising steps of contacting a blood sample obtained from the subject with at least one biomarker for a time and under conditions allowing a biomarker-antibody complex to form between the at least one biomarker and an antibody present in the blood sample; and detecting any biomarker-antibody complex formed. In this method, the at least one biomarker is selected from the group consisting of:

a set of biomarkers indicative of kidney status consisting of RAB20, OAS2, IL1RL1(3), GLRA2, SMAD3, ING4(2), CCL19, CENTD2, ECE1, LGALS3, analogs thereof and antibody-binding fragments thereof,

a set of biomarkers indicative of stable renal transplant consisting of ARPC1B, CYP2E1, CDC20, RIT1, PHF21B, RBM34, MS4A6E, C20orf132, LRRKIP1, CKLF(1), analogs thereof and antibody-binding fragments thereof,

a set of biomarkers indicative of renal transplant lomerulopathy consisting of PODN, HM13(4), TSC22D3(2), EPN1, COL23A1, GIMAP6, ZNF174, MAP3K11, CRB3(2), PRKCDBP, DCLK1, FEN1, TANK(2), GLRX5, RAB22A, MAEL, FAM71D, TTC35, analogs thereof, and antibody-binding fragments thereof, and

a set of biomarkers indicative of IFTA consisting of IL16, MLF1, IFT81(2), DYRK2, NDFIP2, CCNE2, SNX21, TUBB2C, MUC20, ATP1A3, F11R(1), analogs thereof and antibody-binding fragments thereof.

In certain embodiments, the at least one biomarker comprises a plurality of biomarkers, *i.e.*, in other words, the method of the invention comprises steps of: contacting the blood sample with a plurality of biomarkers for a time and under conditions allowing biomarker-antibody complexes to form between the biomarkers and antibodies present in the blood sample; and detecting any biomarker-antibody complex formed.

A blood sample, obtained from the subject and suitable for use in a method of diagnosis of the present invention, may be selected from the group consisting of whole blood, plasma, and serum. Generally, the subject from whom the blood sample is obtained is a dialysis patient or a renal transplant patient.

In certain embodiments, the biomarkers used in the methods of the invention are immobilized on a solid carrier or support, such as beads or array. In certain preferred embodiments, the biomarkers are immobilized on an array.

In the methods provided herein, detection of a biomarker-antibody complex formed between the at least one biomarker and an antibody present in the blood sample may be performed by any suitable method. In certain embodiments, the detection is by immunoassay. For example, the step of detecting a biomarker-antibody complex may comprise contacting the blood sample obtained from the subject with at least one reagent for the detection of the biomarker-antibody complex, such as a labeled anti-human antibody.

In yet another aspect, the present invention provides a kit for the *in vitro* determination of kidney status or renal transplant status in a subject, the kit comprising at least one biomarker described herein. In certain embodiments, the kit comprises a plurality of biomarkers. Preferably, determination of kidney status or renal transplant status is performed using a blood sample obtained from the subject.

In certain embodiments, the at least one biomarker or the plurality of biomarkers is immobilized on a solid support, such as beads or array. Preferably, the at least one biomarker or the plurality of biomarkers is immobilized on an array.

In certain embodiments, a kit of the present invention further comprises at least one reagent for the detection of a biomarker-antibody complex formed between the at least one biomarker included in the kit and an antibody present in a blood sample obtained from a subject. Such a reagent may be a labeled anti-human antibody.

The kit may further comprise instructions for carrying out any of the methods of diagnosis provided herein.

In certain embodiments, one or both of CCL19 and CDC20 is/are not used in the methods of the present invention and/or is/are not present on an inventive array or an inventive kit.

These and other objects, advantages and features of the present invention will become apparent to those of ordinary skill in the art having read the following detailed description of the preferred embodiments.

### Brief Description of the Drawing

**Figure 1** is a table presenting the characteristics of the patients who were tested in the study described in Example 1. Patients 1 to 6 were found to exhibit both TG and IFTA features based on biopsy analysis. Patients 7 to 19 only showed signs of TG. Patients 20 to 29 had IFTA only without C4d deposits in the graft. Patients 30 to 35 were found to have no renal function degradation and had normal biopsies. Dialysis (DIA) patients (who were also tested in the study described in Example 1) are not presented in this table since they had not received kidney graft and therefore did not have any biopsy data.

### Definitions

Throughout the specification, several terms are employed that are defined in the following paragraphs.

As used herein, the term “**subject**” refers to a human or another mammal (e.g., primate, dog, cat, goat, horse, pig, mouse, rat, rabbit, and the like) that can undergo kidney transplantation, but may or may not have undergone kidney transplantation. In many embodiments of the present invention, the subject is a human being. In such embodiments, the subject is often referred to as an “**individual**” or a “**patient**”. As used herein, the term “**renal transplant patient**” refers to an individual that has undergone kidney transplantation. The terms “individual” and “patient” do not denote a particular age.

As used herein, the term “**diagnosis**” refers to a process aimed at determining if an individual is afflicted with a disease or ailment. The terms “**diagnosis of renal transplant status**” and “**determination of renal transplant status**” are used herein interchangeably.

They refer to a process aimed at one or more of: determining if the renal transplant of a patient is stable, determining if a renal transplant patient has a chronic renal transplant rejection disorder, and determining if the chronic renal transplant rejection disorder is renal transplant Iomerulopathy or IFTA. The terms "***diagnosis of kidney status***" and "***determination of kidney status***" are used herein interchangeably. They refer to a process aimed at determining if the kidney of a patient is afflicted with end-stage chronic kidney disease.

The term "***biological sample***" is used herein in its broadest sense. A biological sample is generally obtained from a subject. A sample may be of any biological tissue or fluid with which biomarkers of the present invention may be assayed. Frequently, a sample will be a "clinical sample", *i.e.*, a sample derived from a patient. Such samples include, but are not limited to, bodily fluids which may or may not contain cells, *e.g.*, blood (*e.g.*, whole blood, serum or plasma), urine, saliva, tissue or fine needle biopsy samples, and archival samples with known diagnosis, treatment and/or outcome history. Biological samples may also include sections of tissues such as frozen sections taken for histological purposes. The term "biological sample" also encompasses any material derived by processing a biological sample. Derived materials include, but are not limited to, cells (or their progeny) isolated from the sample, proteins or nucleic acid molecules extracted from the sample. Processing of a biological sample may involve one or more of: filtration, distillation, extraction, concentration, inactivation of interfering components, addition of reagents, and the like. In preferred embodiments of the invention, the biological sample is (or is derived from) whole blood, serum or plasma obtained from a subject.

The terms "***normal***" and "***healthy***" are used herein interchangeably. They refer to an individual or group of individuals who have not undergone kidney transplantation and who have not shown any symptoms of kidney injury, damage or dysfunction. The term "normal" is also used herein to qualify a sample (*e.g.*, a blood sample) obtained from a healthy individual.

In the context of the present invention, the term "***control***", when used to characterize a subject, refers to a subject that is healthy, to a patient that has been diagnosed with chronic renal disease (*e.g.*, end-stage chronic kidney disease), or to a renal transplant patient that has been diagnosed with a stable renal transplant, with renal transplant Iomerulopathy or with IFTA. The term "control sample" refers to one, or more than one, sample that has

been obtained from a healthy subject or from a patient diagnosed with a particular kidney status or renal transplant status as described above.

The terms “**biomarker**” and “**marker**” are used herein interchangeably. They refer to a substance that is a distinctive indicator of a biological process, biological event and/or pathologic condition. The term “**biomarker of kidney status**” refers to a protein selected from the set of proteins provided by the present invention and which is indicative of or specifically recognized by dialysis patients waiting for renal transplantation. The term “**biomarker of renal transplant status**” refers to a protein selected from the set of protein provided by the present invention and which is indicative of or specifically recognized by renal transplant patients with stable renal transplant, renal transplant Iomerulopathy or IFTA.

As used herein, the terms “**indicative of kidney status**” and “**indicative of renal transplant status**”, when applied to a process or event, refers to a process or event which is diagnostic of a kidney status or a renal transplant status, such that the process or event is found significantly more often in subjects with a given kidney status or a given renal transplant status than in subjects with a different kidney status or a different renal transplant status (as determined using routine statistical methods). Preferably, a protein biomarker which is indicative of a given kidney status (e.g., end-stage kidney disease) or a given renal transplant status (e.g., stable renal transplant, renal transplant Iomerulopathy or IFTA) is recognized by at least 60% of subjects who exhibit the kidney status or the renal transplant status, respectively and is recognized by less than 10% of subjects who do not exhibit the kidney status or the renal transplant status. More preferably, a protein biomarker which is indicative of a given kidney status or of a given renal transplant status is recognized by at least 70%, at least 75%, at least 80%, at least 85%, at least 90%, at least 95% or more patients who exhibit the same kidney status or the same renal transplant status and is recognized by less than 10%, less than 8%, less than 5%, less than 2% or less than 1% subjects who do not exhibit the same kidney status or the same renal transplant status.

The terms “**protein**”, “**polypeptide**”, and “**peptide**” are used herein interchangeably, and refer to amino acid sequences of a variety of lengths, either in their neutral (uncharged) forms or as salts, and either unmodified or modified by glycosylation, side chain oxidation, or phosphorylation. In certain embodiments, the amino acid sequence is a full-length native protein. In other embodiments, the amino acid sequence is a smaller fragment of the full-length protein. In still other embodiments, the amino acid sequence is modified by

additional substituents attached to the amino acid side chains, such as glycosyl units, lipids, or inorganic ions such as phosphates, as well as modifications relating to chemical conversion of the chains such as oxidation of sulphhydryl groups. Thus, the term “protein” (or its equivalent terms) is intended to include the amino acid sequence of the full-length native protein or a fragment thereof, subject to those modifications that do not significantly change its specific properties. In particular, the term “protein” encompasses protein isoforms, *i.e.*, variants that are encoded by the same gene, but that differ in their pI or MW, or both. Such isoforms can differ in their amino acid sequence (*e.g.*, as a result of alternative splicing or limited proteolysis), or in the alternative, may arise from differential post-translational modification (*e.g.*, glycosylation, acylation, phosphorylation).

The term “**protein analog**”, as used herein, refers to a polypeptide that possesses a similar or identical function as the protein but need not necessarily comprise an amino acid sequence that is similar or identical to the amino acid sequence of the protein or a structure that is similar or identical to that of the protein. Preferably, in the context of the present invention, a protein analog has an amino acid sequence that is at least about 30%, more preferably at least about 35%, at least about 40%, at least about 45%, at least about 50%, at least about 55%, at least about 60%, at least about 65%, at least about 70%, at least about 75%, at least about 80%, at least about 85%, at least about 90%, at least about 95% or at least about 99%, identical to the amino acid sequence of the protein.

The term “**protein fragment**”, as used herein, refers to a polypeptide comprising an amino acid sequence of at least 5 consecutive amino acid residues (preferably at least about: 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 125, 150, 175, 200, or 250 consecutive amino acid residues) of the amino acid sequence of the protein. The fragment of a protein may or may not possess a functional activity of the protein.

The term “**antibody-binding fragment**”, when used herein in connection with a protein (in particular a protein biomarker), refers to a fragment of the protein that retains the ability of the protein to bind an antibody to form an antigen-antibody complex. In particular, an antibody-binding fragment of a protein biomarker of the invention retains the ability to bind an antibody specifically found in patients with one type of kidney status or renal transplant status. Suitable antibody-binding fragments of a protein biomarker may be identified by one skilled in the art by simple trials to ascertain their ability to bind kidney status-specific antibodies or renal transplant status-specific antibodies.

The term “**homologous**” (or “homology”), as used herein is synonymous with the term “**identity**” and refers to the sequence similarity between two polypeptide molecules or between two nucleic acid molecules. When a position in both compared sequences is occupied by the same base or same amino acid residue, then the respective molecules are homologous at that position. The percentage of homology between two sequences corresponds to the number of matching or homologous positions shared by the two sequences divided by the number of positions compared and multiplied by 100. Generally, a comparison is made when two sequences are aligned to give maximum homology. Homologous amino acid sequences share identical or similar amino acid sequences. Similar residues are conservative substitutions for, or “allowed point mutations” of, corresponding amino acid residues in a reference sequence residue. “Conservative substitutions” of a residue in a reference sequence are substitutions that are physically or functionally similar to the corresponding reference residue, e.g., they have a similar size, shape, electric charge, chemical properties, including the ability to form covalent or hydrogen bonds, or the like. Particularly preferred conservative substitutions are those fulfilling the criteria defined for “accepted point mutation” by Dayhoff *et al.* (“Atlas of Protein Sequence and Structure”, 1978, Nat. Biomed. Res. Foundation, Washington, DC, Suppl. 3, 22: 354-352).

The terms “**protein array**” and “**protein chip**” are used herein interchangeably. They refer to a substrate surface on which different proteins (or protein fragments) have been immobilized, in an ordered manner, at discrete spots on the substrate. Protein arrays may be used to identify protein/protein interactions (e.g., antigen/antibody interactions), to identify substrates of enzymes, or to identify the targets of biologically active small molecules. The term “microarray” more specifically refers to an array that is miniaturized so as to require microscopic examination for visual evaluation.

The term “**protein bead suspension array**” refers to a suspension of one or more identifiable distinct particles whereby each particle contains coding features relating to its size and color or fluorescence signature and to which each of the beads of a particular combination is coated with a protein (e.g., a protein biomarker of the invention). Like protein arrays, protein bead suspension arrays may be used to identify protein/protein interactions (e.g., antigen/antibody interactions), to identify substrates of enzymes, or to identify the targets of biologically active small molecules. Examples of bead suspension arrays include thexMAP® bead suspension array (Luminex Corporation).

The terms “***labeled***”, “***labeled with a detectable agent***” and “***labeled with a detectable moiety***” are used herein interchangeably. These terms are used to specify that an entity (e.g., an antibody) can be visualized, for example, following binding to another entity (e.g., a protein biomarker). Preferably, a detectable agent or moiety is selected such that it generates a signal which can be measured and whose intensity is related to the amount of bound entity. In array-based methods, a detectable agent or moiety is also preferably selected such that it generates a localized signal, thereby allowing spatial resolution of the signal from each spot on the array. Methods for labeling proteins and polypeptides are well known in the art. Labeled polypeptides (e.g., antibodies) can be prepared by incorporation of or conjugation to a label, that is directly or indirectly detectable by spectroscopic, photochemical, biochemical, immunochemical, electrical, optical, or chemical means, or any suitable means. Suitable detectable agents include, but are not limited to, various ligands, radionuclides, fluorescent dyes, chemiluminescent agents, microparticles, enzymes, colorimetric labels, magnetic labels, and haptens.

The term “***treatment***” is used herein to characterize a method that is aimed at (1) delaying or preventing the onset of a disease or condition; or (2) slowing down or stopping the progression, aggravation, or deteriorations of the symptoms of the condition; or (3) bringing about ameliorations or the symptoms of the condition; or (4) curing the condition. A treatment may be administered prior to the onset of the disease, for a prophylactic or preventive action. It may also be administered after initiation of the disease, for a therapeutic action.

## **Detailed Description of Certain Preferred Embodiments**

As mentioned above, the present invention provides biomarkers that can be used for detecting the presence of antibodies that are selectively and specifically indicative of chronic renal disease, stable renal transplant, renal transplant lomerulopathy (TG), and IFTA, in *in vitro* biological samples obtained from patients. Also provided are methods, arrays and kits for using these biomarkers for determining renal transplant or kidney status in a subject.

### **I – Biomarkers**

As described in the Examples Section below, the present Applicants have identified protein biomarkers relevant to chronic renal transplant rejection disorders using the ProtoArray Human Protein Microarray commercially available from Invitrogen. This

microarray contains more than 8000 human proteins, including proteases/peptidases, secreted proteins, transcription factors, cell death proteins, protein kinases, nuclear proteins, membrane proteins, and metabolism proteins. More specifically, the Applicants have screened samples of serum obtained from dialysis individuals diagnosed with end-stage renal disorder, patients with stable renal transplant, patients diagnosed with renal transplant lomerulopathy, and patients diagnosed with IFTA; and then compared the binding patterns of each group tested with each one of the other three groups. This work led to the identification of highly specific protein biomarkers, *i.e.*, protein biomarkers that are recognized only by one group of the patients tested and that are not recognized by any of the three other groups of patients tested.

The proteins that were selectively recognized by the dialysis patients with end-stage renal disorder (and not by the other groups of patients) are: RAB20 (member RAS oncogene family, which is encoded by a gene whose GenBank Accession Number is NM\_017817.1), OAS2 (2',5'-oligoadenylate synthetase 2 69/71 kDa, which is encoded by a gene whose GenBank Accession Number is BC049215.1); IL1RL1(3) (interleukin 1 receptor-like 1, transcript variant 3, which is encoded by a gene whose GenBank Accession Number is NM\_173459.1); GLRA2 (glycine receptor, alpha 2, which is encoded by a gene whose GenBank Accession Number is BC032864.2); SMAD3 (SMAD family member 3, which is encoded by a gene whose GenBank Accession Number is NM\_005902); ING4(2) (inhibitor of growth family, member 4, transcript variant 2, which is encoded by a gene whose GenBank Accession Number is NM\_198287.1); CCL19 (chemokine (C-C motif) ligand 19, which is encoded by a gene whose GenBank Accession Number is NM\_006274.2); CENTD2 (centaurin, delta 2, which is encoded by a gene whose GenBank Accession Number is BC056401.1); ECE1 (endothelin converting enzyme 1, which is encoded by a gene whose GenBank Accession Number is NM\_001397.1); and LGALS3 (lectin, galactoside-binding, soluble, 3, which is encoded by a gene whose GenBank Accession Number is BC001120.2).

The proteins that were selectively recognized by the patients with stable renal transplant (and not by the other groups of patients) are: ARPC1B (actin related protein 2/3 complex, subunit 1B, 41kDa, which is encoded by a gene whose GenBank Accession Number is NM\_005720.2); CYP2E1 (cytochrome P450, family 2, subfamily E, polypeptide 1, which is encoded by a gene whose GenBank Accession Number is NM\_000773.3); CDC20 (cell division cycle 20 homolog (*S. cerevisiae*), which is encoded by a gene whose GenBank Accession Number is BC001088.2); RIT1 (Ras-like without CAAX 1, which is encoded by a gene whose GenBank Accession Number is NM\_006912.4); PHF21B (PHD finger protein 21B, which is

encoded by a gene whose GenBank Accession Number is NM\_138415.2); RBM34 (RNA binding motif protein 34, which is encoded by a gene whose GenBank Accession Number is NM\_015014.1); MS4A6E (membrane-spanning 4-domains, subfamily A, member 6E, which is encoded by a gene whose GenBank Accession Number is NM\_139249.2); C20orf132 (chromosome 20 open reading frame 132, which is encoded by a gene whose GenBank Accession Number is BC057767.1); LRRFIP1 (leucine rich repeat (in FLII) interacting protein 1, which is encoded by a gene whose GenBank Accession Number is BC010662.1); and CKLF(1) (chemokine-like factor, transcript variant 1, which is encoded by a gene whose GenBank Accession Number is NM\_016951.2).

The proteins that were selectively recognized by the patients with renal transplant lomerulopathy (TG) (and not by the other groups of patients) are: PODN (podocan, which is encoded by a gene whose GenBank Accession Number is BC030608.2); HM13(4) (histocompatibility (minor) 13, transcript variant 4, which is encoded by a gene whose GenBank Accession Number is NM\_178582.1); TSC22D3(2) (TSC22 domain family, member 3, transcript variant 2, which is encoded by a gene whose GenBank Accession Number is NM\_004089.3); EPN1 (epsin 1, which is encoded by a gene whose GenBank Accession Number is NM\_013333.3); COL23A1 (collagen, type XXIII, alpha 1, which is encoded by a gene whose GenBank Accession Number is BC042428.1); GIMAP6 (GTPase, IMAP family member 6, which is encoded by a gene whose GenBank Accession Number is BC060760.1); ZNF174 (zinc finger protein 174, which is encoded by a gene whose GenBank Accession Number is BC000876.1); MAP3K11 (mitogen-activated protein kinase kinase kinase 11, which is encoded by a gene whose GenBank Accession Number is NM\_002419.3); CRB3(2) (crumbs homolog 3 (*Drosophila*), transcript variant 2, which is encoded by a gene whose GenBank Accession Number is NM\_139161.3); PRKCDBP (protein kinase C, delta binding protein, which is encoded by a gene whose GenBank Accession Number is BC011585.1); DCLK1 (doublecortin-like kinase 1, which is encoded by a gene whose GenBank Accession Number is NM\_004734.2); FEN1 (flap structure-specific endonuclease 1, which is encoded by a gene whose GenBank Accession Number is NM\_004111.4); TANK(2) (TRAF family member-associated NFKB activator, transcript variant 2, which is encoded by a gene whose GenBank Accession Number is NM\_133484.1); GLRX5 (glutaredoxin 5, which is encoded by a gene whose GenBank Accession Number is NM\_016417.2); RAB22A (RAB22A, member RAS oncogene family, which is encoded by a gene whose GenBank Accession Number is NM\_020673.2); MAEL (maelstrom homolog (*Drosophila*), which is encoded by a gene whose GenBank Accession Number is NM\_032858.1); FAM71D (family with sequence similarity 71,

member D, which is encoded by a gene whose GenBank Accession Number is BC050401.1); and TTC35 (tetratricopeptide repeat domain 35, which is encoded by a gene whose GenBank Accession Number is NM\_014673.3).

The proteins that were selectively recognized by the patients with IFTA (and not by the other groups of patients) are: IL16 (interleukin 16 (lymphocyte chemoattractant factor), which is encoded by a gene whose GenBank Accession Number is BC040272.1); MLF1 (myeloid leukemia factor 1, which is encoded by a gene whose GenBank Accession Number is NM\_022443.3);IFT81(2) (intraflagellar transport 81 homolog (*Chlamydomonas*), transcript variant 2, which is encoded by a gene whose GenBank Accession Number is NM\_031473.2); DYRK2 (dual-specificity tyrosine-(Y)-phosphorylation regulated kinase 2, which is encoded by a gene whose GenBank Accession Number is BC006375.2); NDFIP2 (Nedd4 family interacting protein 2, which is encoded by a gene whose GenBank Accession Number is BC021988.1); CCNE2 (cyclin E2, which is encoded by a gene whose GenBank Accession Number is BC020729.1); SNX21 (sorting nexin family member 21, which is encoded by a gene whose GenBank Accession Number is BC019823.1); TUBB2C (tubulin, beta 2C, which is encoded by a gene whose GenBank Accession Number is BC029529.1); MUC20 (mucin 20, cell surface associated, which is encoded by a gene whose GenBank Accession Number is BC029267.1); ATP1A3 (ATPase, Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> transporting, alpha 3 polypeptide, which is encoded by a gene whose GenBank Accession Number is NM\_152296.3); and F11R(1) (F11 receptor, transcript variant 1, which is encoded by a gene whose GenBank Accession Number is NM\_016946.4).

### ***Inventive Protein Biomarkers***

Accordingly, the present invention provides a set of protein biomarkers that are specifically recognized by dialysis patients diagnosed with end-stage renal disorder, and that can be used for detecting the presence of antibodies that are selectively indicative of end-stage renal disorder in *in vitro* biological samples (in particular blood samples) obtained from patients. This set of protein biomarkers consists of RAB20, OAS2, IL1RL1(3), GLRA2, SMAD3, ING4(2), CCL19, CENTD2, ECE1, LGALS3, analogs thereof and antibody-binding fragments thereof.

The present invention also provides a set of protein biomarkers that are specifically recognized by renal transplant patients with stable renal implants, and that can be used for detecting the presence of antibodies that are selectively indicative of stable renal transplant in *in vitro* biological samples (in particular blood samples) obtained from patients. This set of

protein biomarkers consists of ARPC1B, CYP2E1, CDC20, RIT1, PHF21B, RBM34, MS4A6E, C20orf132, LRRFIP1, CKLF(1), analogs thereof and antibody-binding fragments thereof.

The present invention also provides a set of protein biomarkers that are specifically recognized by renal transplant patients diagnosed with renal transplant lomerulopathy, and that can be used for detecting the presence of antibodies that are specifically indicative of renal transplant lomerulopathy in *in vitro* biological samples (in particular blood samples) obtained from patients. This set of protein biomarkers consists of PODN, HM13(4), TSC22D3(2), EPN1, COL23A1, GIMAP6, ZNF174, MAP3K11, CRB3(2), PRKCDBP, DCLK1, FEN1, TANK(2), GLRX5, RAB22A, MAEL, FAM71D, TTC35, analogs thereof, and antibody-binding fragments thereof.

The present invention also provides a set of protein biomarkers that are specifically recognized by renal transplant patients diagnosed with IFTA, and that can be used for detecting the presence of antibodies that are specifically indicative of IFTA in *in vitro* biological samples (in particular blood samples) obtained from patients. This set of protein biomarkers consists of IL16, MLF1, IFT81(2), DYRK2, NDFIP2, CCNE2, SNX21, TUBB2C, MUC20, ATP1A3, F11R(1), analogs thereof and antibody-binding fragments thereof.

The present invention also provides a set of protein biomarkers that can be used to discriminate between patients with end-stage renal disorder, patients with stable renal transplant, patients with renal transplant lomerulopathy, and patients with IFTA. The set of protein biomarkers consists of RAB20, OAS2, IL1RL1(3), GLRA2, SMAD3, ING4(2), CCL19, CENTD2, ECE1, LGALS3, ARPC1B, CYP2E1, CDC20, RIT1, PHF21B, RBM34, MS4A6E, C20orf132, LRRFIP1, CKLF(1), PODN, HM13(4), TSC22D3(2), EPN1, COL23A1, GIMAP6, ZNF174, MAP3K11, CRB3(2), PRKCDBP, DCLK1, FEN1, TANK(2), GLRX5, RAB22A, MAEL, FAM71D, TTC35, IL16, MLF1, IFT81(2), DYRK2, NDFIP2, CCNE2, SNX21, TUBB2C, MUC20, ATP1A3, F11R(1), analogs thereof and antibody-binding fragments thereof. The pattern of recognition of these proteins by a patient can be used to diagnose a kidney status or a renal transplant status.

Thus, the present invention further provides for the use of at least one of the protein biomarkers described herein to diagnose kidney status or renal transplant status in a subject. The present invention also provides for the use of any combination (*i.e.*, at least two) of the protein biomarkers described herein to diagnose kidney status or renal transplant status in a subject. The present invention also provides for the use of all of the protein biomarkers described herein to diagnose kidney status or renal transplant status in a subject. The

present invention further provides for the use of all of the protein biomarkers indicative of stable renal transplant, renal transplant lomerulopathy, and IFTA to diagnose renal transplant status. The present invention further provides for the use of all of the protein biomarkers indicative of end-stage kidney disorder to diagnose kidney status.

Other biomarkers provided by the present invention include nucleic acid molecules comprising polynucleotide sequences coding for the inventive protein biomarkers described herein (or analogs and fragments thereof) and polynucleotides that hybridize with portions of these nucleic acid molecules.

#### ***Preparation of Protein Biomarkers***

Protein biomarkers to be used in the methods of diagnosis of the present invention may be prepared by any suitable method, including chemical synthesis and recombinant methods.

For example, the biomarkers of the invention may be prepared using standard chemical methods. Solid-phase peptide synthesis, which was initially described by R.B. Merrifield (*J. Am. Chem. Soc.* 1963, 85: 2149-2154) is a quick and easy approach to synthesizing peptides and peptidic molecules of known sequences. A compilation of such solid-state techniques may be found, for example, in "*Solid Phase Peptide Synthesis*" (*Methods in Enzymology*, G.B. Fields (Ed.), 1997, Academic Press: San Diego, CA, which is incorporated herein by reference in its entirety). Most of these synthetic procedures involve the sequential addition of one or more amino acid residues or suitable protected amino acid residues to a growing peptide chain. For example, the carboxy group of the first amino acid is attached to a solid support *via* a labile bond, and reacted with the second amino acid, whose amino group has, beforehand, been chemically protected to avoid self-condensation. After coupling, the amino acid group is deprotected, and the process is repeated with the following amino acid. Once the desired peptide is assembled, it is cleaved off from the solid support, precipitated, and the resulting free peptide may be analyzed and/or purified as desired. Solution methods, as described, for example, in "*The Proteins*" (Vol. II, 3<sup>rd</sup> Ed., H. Neurath *et al.* (Eds.), 1976, Academic Press: New York, NY, pp. 105-237), may also be used to synthesize the biomarkers of the invention.

Alternatively, the protein biomarkers provided herein can be produced by recombinant DNA methods. These methods generally involve isolation of the gene encoding the desired protein, transfer of the gene into a suitable vector, and bulk expression in a cell

culture system. The DNA coding sequences for the polypeptides of the invention may be readily prepared synthetically using methods known in the art (see, for example, M.P. Edge *et al.*, *Nature*, 1981, 292: 756-762).

After synthesis, the DNA encoding the desired peptide is inserted into a recombinant expression vector, which may be a plasmid, phage, viral particle, or other nucleic acid molecule-containing vectors or nucleic acid molecule-containing vehicles which, when introduced into an appropriate host cell, contains the necessary genetic elements to direct expression of the coding sequence of interest. Standard techniques well known in the art can be used to insert the nucleic acid molecule into the expression vector. The insertion results in the coding sequence being operatively linked to the necessary regulatory sequences.

Host cells for use in the production of proteins are well known and readily available. Examples of host cells include bacteria cells such as *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, attenuated strains of *Salmonella typhimurium*, and the like; yeast cells such as *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Kluyveromyces* strains, *Candida*, or any yeast strain capable of expressing heterologous proteins; insect cells such as *Spodoptera frugiperda*; non-human mammalian tissue culture cells such as Chinese Hamster Ovary (CHO) cells, monkey COS cells, and mouse 3T3 cells; and human tissue culture cells such as HeLa cells, HL-60 cells, kidney 293 cells and epidermal S431 cells.

Several expression vectors to produce polypeptides in well known expression systems are commercially available. For example, the plasmids pSE420 (available from Invitrogen, San Diego, CA) and pBR322 (available from New England Biolabs, Beverly, MA) may be used for the production of the inventive peptides in *E. coli*. Similarly, the plasmid pYES2 (Invitrogen) may be used for peptide production in *S. cerevisiae* strains of yeast. The commercially available MacBacR™ kit (Invitrogen) for baculovirus expression system or the BaculoGold™ Transfection Kit available from PharMingen (San Diego, CA) may be used for production in insect cells, while the plasmids pcDNA I, pcDNA 3, and pRc/RSV, commercially available from Invitrogen, may be used for the production of the peptides of the invention in mammalian cells such as Chinese Hamster Ovary (CHO) cells.

Other expression vectors and systems can be obtained or produced using methods well known to those skilled in the art. Expression systems containing the requisite control sequences, such as promoters and polyadenylation signals, and preferably enhancers are readily available for a variety of hosts (see, for example, Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning*:

*A Laboratory Manual*, 2<sup>nd</sup> Ed., 1989, Cold Spring Harbor Press: Cold Spring, NY; and R. Kaufman, Methods in Enzymology, 1990, 185: 537-566).

The expression vector including DNA that encodes the desired protein is used to transform the compatible host cell. The host cell is then cultured and maintained under conditions favoring expression of the desired protein. The protein thus produced is recovered and isolated, either directly from the culture medium or by lysis of the cells. If desired, it can then be characterized by different methods such as Nuclear Magnetic Resonance (NMR) or X-ray crystallography.

As understood by one skilled in the art, a protein biomarker of the present invention may be produced as a fusion protein (*i.e.*, a molecule in which an antibody-binding moiety is linked to a polypeptide entity). Such a polypeptide entity may be selected to confer any of a number of advantageous properties to the resulting fusion protein. For example, the polypeptide entity may be selected to provide increased expression of the recombinant fusion protein. Alternatively or additionally, the polypeptide entity may facilitate purification of the fusion protein for example, by acting as a ligand in affinity purification. A proteolytic cleavage site may be added to the recombinant protein so that the desired sequence can ultimately be separated from the polypeptide entity after purification. The polypeptide entity may also be selected to confer an improved stability to the fusion protein, when stability is a goal. Examples of suitable polypeptide entities include, for example, polyhistidine tags, that allow for the easy purification of the resulting fusion protein on a nickel chelating column. Glutathione-S-transferase (GST), maltose B binding protein, or protein A are other examples of suitable polypeptide entities that can be fused to a protein biomarker of the invention using commercial fusion expression vectors.

Alternatively, protein biomarkers of the invention may be prepared using commercially available proteins.

In certain embodiments, a protein biomarker of the invention is provided immobilized onto a solid carrier or support (*e.g.*, a bead or an array). Methods for immobilizing polypeptide molecules onto a solid surface are known in the art. In particular, the invention provides an array for the diagnosis of kidney status or renal transplant status, consisting essentially of biomarkers described herein, immobilized to its surface. In certain embodiments, the array has, immobilized to its surface, at least one (*i.e.*, one or more than one) of the inventive protein biomarkers that are specific for dialysis patients with end-stage renal disorder, at least one of the inventive protein biomarkers that are specific for patients

with stable renal transplant, at least one of the inventive protein biomarkers that are specific for patients with renal transplant Iomerulopathy, and at least one of the inventive protein biomarkers that are specific for patients with IFTA. In a particular embodiment, the array has, immobilized to its surface, all of the inventive protein biomarkers that are specific for dialysis patients with end-stage renal disorder, all of the inventive protein biomarkers that are specific for patients with stable renal transplant, all of the inventive protein biomarkers that are specific for patients with renal transplant Iomerulopathy, and all of the inventive protein biomarkers that are specific for patients with IFTA. An array of the invention may further comprise various proteins and other controls to allow verifications of reagents background, and detection conditions during probing, assessment of the performance of an assay and/or normalization. Examples of such controls include anti-biotin antibodies which are recognized by the detection IgG antibody, and the Influenza A antigen, which is recognized by approximately 95% of the total population.

The terms “array for diagnosing kidney status or renal transplant status” and “array for determining kidney status or renal transplant status” are used herein interchangeably. They refer to an array for the detection, in an *in vitro* biological sample, of antibodies that are indicative of one and only one kidney status or renal transplant status: end-stage renal disorder, stable renal transplant, renal transplant Iomerulopathy or IFTA.

A protein biomarker may be immobilized by being either covalently or passively bound to the surface of a solid carrier or support. Examples of suitable carrier or support materials include, but are not limited to, agarose, cellulose, nitrocellulose, dextran, Sephadex, Sepharose, carboxymethyl cellulose, polyacrylamides, polystyrene, polyvinyl chloride, polypropylene, gabbros, filter paper, magnetite, ion-exchange resin, glass, polyamine-methyl-vinyl-ether-maleic acid copolymer, amino acid copolymer, ethylene-maleic acid copolymer, nylon, silk, and the like. Immobilization of a protein biomarker on the surface of a solid carrier or support may involve crosslinking, covalent binding or physical adsorption, using methods well known in the art. The solid carrier or support may be in the form of a bead, a particle, a microplate well, an array, a cuvette, a tube, a membrane, or any other shape suitable for conducting a diagnostic method according to the invention (*e.g.*, using an immunoassay). In certain embodiments, immobilization of a protein biomarker to a solid carrier or support includes gel electrophoresis followed by transfer to a membrane (typically nitrocellulose or PVDF) in a process called western blotting (or immunoblot well known in the art).

## **II – Diagnosis Methods**

The inventive protein biomarkers may be used to detect, in a biological sample obtained from a subject, the presence of antibodies that are indicative of kidney status or renal transplant status.

Accordingly, the present invention provides methods for diagnosing or determining kidney status or renal transplant status in a subject. Such methods comprise contacting a biological sample obtained from the subject (in particular a blood sample) with at least one protein biomarker described herein for a time and under conditions allowing a biomarker-antibody complex to form between the at least one biomarker and an antibody present in the biological sample; and detecting any biomarker-antibody complex formed. Kidney status or renal transplant status may be determined based on the nature of the at least one biomarker used and the detection (or not) of a biomarker-antibody complex.

In certain embodiments, the method comprises contacting a biological sample obtained from the subject (in particular a blood sample) with a plurality of protein biomarkers described herein for a time and under conditions allowing biomarker-antibody complexes to form between the biomarkers and antibodies present in the biological sample; and detecting any biomarker-antibody complex formed. Kidney status or renal transplant status may be determined based on the binding pattern obtained (*i.e.*, the nature of the biomarkers used and the detection (or not) of biomarker-antibody complexes).

The plurality of biomarkers may be any combination of the biomarkers described herein. For example, the plurality of biomarkers may consist of only biomarkers that are indicative of one of the 4 pathologies (*e.g.*, only biomarkers indicative of IFTA or only biomarkers indicative of renal transplant lomerulopathy). Alternatively, the plurality of biomarkers may consist of a combination of biomarkers of the 4 different pathologies. In one embodiment, the plurality of biomarkers consists of all the biomarkers described herein. Alternatively, the plurality of biomarkers may consist of only biomarkers that are indicative of renal transplant status (*i.e.*, biomarkers that are indicative of stable renal transplant, biomarkers that are indicative of renal transplant lomerulopathy and biomarkers that are indicative of IFTA).

### ***Biological Samples***

The methods of diagnosis of the present invention may be applied to the study of any type of biological samples allowing one or more inventive biomarkers to be assayed. Examples of suitable biological samples include, but are not limited to, blood samples, and urine. Preferred biological samples are blood samples, *i.e.*, whole blood, serum or plasma. Biological samples used in the practice of the invention may be fresh or frozen samples collected from a subject, or archival samples with known diagnosis, treatment and/or outcome history. Biological samples may be collected by any non-invasive means, such as, for example, by drawing blood from a subject.

In preferred embodiments, the inventive methods are performed on the biological sample itself without, or with limited, processing of the sample.

However, alternatively, the inventive methods may be performed on a protein extract prepared from the biological sample. In this case, the protein extract preferably contains the total protein content. Methods of protein extraction are well known in the art (see, for example, “*Protein Methods*”, D.M. Bollag et al., 2<sup>nd</sup> Ed., 1996, Wiley-Liss; “*Protein Purification Methods: A Practical Approach*”, E.L. Harris and S. Angal (Eds.), 1989; “*Protein Purification Techniques: A Practical Approach*”, S. Roe, 2<sup>nd</sup> Ed., 2001, Oxford University Press; “*Principles and Reactions of Protein Extraction, Purification, and Characterization*”, H. Ahmed, 2005, CRC Press: Boca Raton, FL). Various kits can be used to extract proteins from bodily fluids and tissues. Such kits are commercially available from, for example, BioRad Laboratories (Hercules, CA), BD Biosciences Clontech (Mountain View, CA), Chemicon International, Inc. (Temecula, CA), Calbiochem (San Diego, CA), Pierce Biotechnology (Rockford, IL), and Invitrogen Corp. (Carlsbad, CA). User Guides that describe in great detail the protocol to be followed are usually included in all these kits. Sensitivity, processing time and costs may be different from one kit to another. One of ordinary skill in the art can easily select the kit(s) most appropriate for a particular situation.

#### ***Detection of Biomarker-Antibody Complexes***

The diagnostic methods of the present invention generally involve detection of at least one complex formed between a protein biomarker and an antibody present in a biological sample. In the practice of the invention, detection of such a biomarker-antibody complex may be performed by any suitable method (see, for example, E. Harlow and A. Lane, “*Antibodies: A Laboratories Manual*”, 1988, Cold Spring Harbor Laboratory: Cold Spring Harbor, NY).

For example, detection of a biomarker-antibody complex may be performed using an immunoassay. A wide range of immunoassay techniques is available, including immunerulopathy, enzyme immunoassays (EIA), enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA), and immunofluorescence immunoprecipitation. Immunoassays are well known in the art. Methods for carrying out such assays as well as practical applications and procedures are summarized in textbooks. Examples of such textbooks include P. Tijssen, In: Practice and theory of enzyme immunoassays, eds. R.H. Burdon and v. P.H. Knippenberg, Elsevier, Amsterdam (1990), pp. 221-278 and various volumes of Methods in Enzymology, Eds. S.P. Colowick *et al.*, Academic Press, dealing with immunological detection methods, especially volumes 70, 73, 74, 84, 92 and 121. Immunoassays may be competitive or non-competitive.

For example, any of a number of variations of the sandwich assay technique may be used to perform an immunoassay. Briefly, in a typical sandwich assay applied to the detection of antibodies indicative of a kidney status or a renal transplant status according to the present invention, an unlabeled protein biomarker is immobilized on a solid substrate and the sample to be tested is brought into contact with the bound biomarker for a time and under conditions allowing formation of a biomarker-antibody complex. Following incubation, a secondary antibody that is labeled with a detectable moiety and that specifically recognizes antibodies from the species tested (*e.g.*, an anti-human IgG for human subjects) is added and incubated under conditions allowing the formation of a ternary complex between any biomarker-bound antibody and the labeled secondary antibody. Any unbound material is washed away, and the presence of any antibody indicative of a kidney status or a renal transplant status is determined by observation of the signal directly or indirectly produced by the detectable moiety. Variations in this assay include an assay in which both the biological sample and the labeled secondary antibody are added simultaneously to the immobilized biomarker (or biomarkers).

The secondary antibody may be labeled with any suitable detectable moiety, *i.e.*, any entity which, by its chemical nature, provides an analytical identifiable signal allowing detection of the ternary complex, and consequently detection of the biomarker-antibody complex.

Detection may be either qualitative or quantitative. Methods for labeling biological molecules such as antibodies are well-known in the art (see, for example, "Affinity Techniques. Enzyme Purification: Part B", Methods in Enzymol., 1974, Vol. 34, W.B. Jakoby

and M. Wilneck (Eds.), Academic Press: New York, NY; and M. Wilchek and E.A. Bayer, *Anal. Biochem.*, 1988, 171: 1-32).

The most commonly used detectable moieties in immunoassays are enzymes and fluorophores. In the case of an enzyme immunoassay (EIA), an enzyme such as horseradish peroxidase, glucose oxidase, beta-galactosidase, alkaline phosphatase, and the like, is conjugated to the second antibody, generally by means of glutaraldehyde or periodate. The substrate to be used with the specific enzymes is generally chosen for the production of a detectable color change, upon hydrolysis of the corresponding enzyme. In the case of immunofluorescence, the second antibody is chemically coupled to a fluorescent moiety without alteration of its binding capacity. After binding of the fluorescently labeled antibody to the biomarker-antibody complex and removal of any unbound material, the fluorescent signal generated by the fluorescent moiety is detected, and optionally quantified. Alternatively, the second antibody may be labeled with a radioisotope, a chemiluminescent moiety, or a bioluminescent moiety.

#### ***Determination of Kidney Status or Renal Transplant Status***

In the methods of the present invention, detection of a biomarker-antibody complex is indicative of the presence of specific antibodies in the biological sample tested and is therefore indicative of the kidney status or renal transplant status of the subject from whom the biological sample has been obtained. Thus, methods of the present invention may be used for determining (or diagnosing) kidney status (*i.e.*, end-stage kidney disorder) or renal transplant status (*i.e.*, stable renal transplant, renal transplant lomerulopathy, or IFTA). In particular, methods of the invention may be used for testing subjects after renal transplant as a way of monitoring renal transplant status.

It will be appreciated by one skilled in the art that diagnosis (or determination) of kidney status or renal transplant status may be made solely on the results provided by a method described herein. Alternatively, a physician may also consider other clinical or pathological parameters used in existing methods to diagnose renal transplant status. Thus, results obtained using methods of the present invention may be compared to and/or combined with results from other tests, assays or procedures performed for the diagnosis of kidney status or renal transplant status. Such comparison and/or combination may help provide a more refine diagnosis.

Alternatively or additionally, results from diagnosis methods of the present invention may be used in combination with results from one or more assays that employ other biomarkers of renal transplant status. Thus, in certain embodiments, diagnostics of renal transplant status may be based on results from a method of the invention and results from one or more additional assays using different biomarkers.

#### ***Selection of Appropriate Treatment***

The biomarkers and methods of diagnostic provided by the present invention have the potential to radically change the way in which transplant patients are managed. The methods are non-invasive, and have no associated morbidity or mortality. They require only small volumes of samples, and are highly cost-effective when compared to other clinical and biochemical modalities such as biopsies. They are rapid, and can easily be repeated over time allowing a frequent surveillance and monitoring of renal transplant status and function. In addition, the assays have the potential for development of automated analysis for the clinical laboratory.

Thus, using methods described herein, skilled physicians may select and prescribe treatments adapted to each individual patient based on the diagnosis (or determination) of the renal transplant status. In particular, the present invention provides physicians with a means to diagnose early renal transplant lomerulopathy, which will allow for early treatment, when intervention is likely to have its greatest effect. Frequent non-invasive renal transplant monitoring according to the invention could allow for immunosuppression doses to be increased or decreased according to specific individual needs. For example, immunosuppression could be lowered, even gradually weaned off, in patients with stable renal transplant. Decision to reduce or eliminate immunosuppressive drugs could be made with a strategy to safely monitor the results before clinically apparent changes in kidney function occur. Alternatively, for patients in whom early rejection is detected, immunosuppression could be increased until a satisfactory response is achieved. Adequate response to treatment and resolution of rejection could be rapidly verified, preventing over-immunosuppression and its associated consequences.

The methods of the present invention may also find applications in the development of new therapeutics, such as new immunosuppressive drugs, for the management or treatment of renal transplant patients.

#### **III - Kits**

In another aspect, the present invention provides kits comprising materials useful for carrying out the diagnostic methods of the invention. The diagnostic procedures described herein may be performed by clinical laboratories, experimental laboratories, or practitioners. The invention provides kits which can be used in these different settings.

In certain embodiments, an inventive kit comprises at least one biomarker described herein, preferably in an amount that is suitable for detecting antibodies in a biological sample, and optionally, instructions for using the kit according to a method of the invention. The biomarkers may or may not be immobilized on a substrate surface (*e.g.*, beads, array and the like).

In preferred embodiments, an inventive kit comprises a plurality of biomarkers described herein, preferably each one in an amount that is suitable for detecting antibodies in a biological sample. The plurality of biomarkers may be any combination of the biomarkers described herein. For example, kits that are specifically designed for the diagnostic of one of the 4 pathologies will preferably comprise only biomarkers that are indicative of the pathology of interest (*e.g.*, only biomarkers indicative of IFTA, or only biomarkers indicative of renal transplant lomerulopathy). Alternatively, kits that are designed for the determination of kidney status or renal transplant status will preferably comprise a combination of biomarkers of the 4 different pathologies. In one embodiment, the plurality of biomarkers included in the kit will consist of all the biomarkers described herein. Alternatively, kits that are designed for the determination of renal transplant status only will preferably comprise a combination of biomarkers that are indicative of renal transplant status (*i.e.*, biomarkers that are indicative of stable renal transplant, biomarkers that are indicative of renal transplant lomerulopathy and biomarkers that are indicative of IFTA).

In addition, an inventive kit may further comprise at least one reagent for the detection of a biomarker-antibody complex formed between a biomarker included in the kit and an antibody present in a biological sample obtained from a patient. Such a reagent may be, for example, a labeled antibody that specifically recognizes antibodies from the species tested (*e.g.*, an anti-human IgG), as described above. If the biomarkers are provided attached to the surface of an array, a kit of the invention may comprise only one reagent for the detection of biomarker-antibody complexes (*e.g.*, a fluorescently-labeled anti-human antibody).

Depending on the procedure, the kit may further comprise one or more of: extraction buffers and/or reagents, western blotting buffers and/or reagents, immunodetection buffers and/or reagents, labeling buffers and/or reagents, and detection means. Protocols for using these buffers and reagents for performing different steps of the procedure may be included in the kit.

The different reagents included in an inventive kit may be supplied in a solid (*e.g.*, lyophilized) or liquid form. The kits of the present invention may optionally comprise different containers (*e.g.*, vial, ampoule, test tube, flask or bottle) for each individual buffer and/or reagent. Each component will generally be suitable as aliquoted in its respective container or provided in a concentrated form. Other containers suitable for conducting certain steps of the disclosed methods may also be provided. The individual containers of the kit are preferably maintained in close confinement for commercial sale.

In certain embodiments, a kit further comprises instructions for using its components for the diagnosis of kidney status or renal transplant status in a subject according to a method of the invention. Instructions for using the kit according to methods of the invention may comprise instructions for processing the biological sample obtained for the subject and/or for performing the test, and/or instructions for interpreting the results. A kit may also contain a notice in the form prescribed by a governmental agency regulating the manufacture, use or sale of pharmaceuticals or biological products.

## Examples

The following examples describe some of the preferred modes of making and practicing the present invention. However, it should be understood that the examples are for illustrative purposes only and are not meant to limit the scope of the invention. Furthermore, unless the description in an Example is presented in the past tense, the text, like the rest of the specification, is not intended to suggest that experiments were actually performed or data were actually obtained.

### **Example 1: Biomarkers of Kidney or Renal Transplant Status**

#### **Materials and Methods**

**Patients.** 45 patients who received a renal transplant in the Nantes University Hospital (Nantes, France) between 1986 and 2007, or who are waiting for one, were retrospectively

included in the present study and divided into four groups according to the outcome of their kidney graft. The first group, Transplant Glomerulopathy (TG), comprised 19 patients among whom 6 were in late stage TG and 13 were in early stage TG. The diagnostic of TG is based on the histology of the graft biopsy such as C4d deposits and glomerular basement membrane duplication. The IFTA group was composed of 10 patients who showed evidence of Interstitial Fibrosis and Tubular Atrophy, but no presence of antibody or C4d deposits, and this was also diagnosed histologically after the biopsy. 10 patients who were undergoing dialysis (DIA) while waiting for renal transplantation were included in the third group. The last group was made of renal transplant patients considered as stable (STA), *i.e.*, patients under immunosuppressive treatment showing a stable renal function.

Sera were available from all these patients at the Etablissement Français du Sang (Nantes, France). Patients' characteristics are summarized in the table presented on Figure 1. Sera were collected at the time of biopsy from patients of the TG, STA and IFTA groups, and a few days before transplantation from DIA patients. Sera were stored at -80°C prior to being tested.

**Sera Screening on Protein Microarrays (ProtoArrays® Invitrogen).** Sera were sent to Invitrogen Corporation (Brandford, Connecticut, US) for analysis.

**Human Protein Collection and Protein Microarray Manufacture.** Over 8000 human clones obtained from Invitrogen's Ultimate ORF collection and Gateway collection of kinase clones were transferred into insect cells *via* baculovirus infection to produce recombinant proteins tagged with Glutathione-S-Transferase (GST). Recombinant proteins were then purified using GST affinity, under native conditions. Because of their production in insect cells and of the particular purification conditions used, the proteins thus obtained are expected to contain appropriate post-translational modifications and to maintain their native conformations. A contact-type printer equipped with 48 matched quill-type pins printed the recombinant proteins in duplicates on a glass slide coated with a thin layer of nitrocellulose.

**Protein Microarray Probing.** Once printed with duplicates of recombinant proteins and appropriate negative and positive controls, microarray slides were blocked using a blocking buffer containing 50 mM HEPES, 200 mM NaCl, 0.08% Triton X-100, 25% glycerol, 20 mM reduced glutathione, 1.0 mM DTT and 1% BSA, at 4°C for 1 hour. Microarrays were then probed with a 1:500 dilution of serum sample (one microarray per serum) diluted in 5 mL of freshly prepared PBST buffer and incubated for 90 minutes at 4°C with gentle agitation.

Microarrays were washed five times in 5 mL PBST buffer. Slides were incubated with an Alexa Fluor<sup>®</sup> 647-conjugated goat anti-human IgG antibody diluted in 5 mL probe buffer to a 1 mg/mL final concentration at 4°C for 90 minutes. After incubation, slides were washed as described above and dried by spinning in a table top centrifuge equipped with a plate rotor at 1000 rpm for 2 minutes. Arrays were then scanned using an Axon GenePix-4000B fluorescent microarray scanner.

**Data Acquisition.** The GenePix 6.0 software was used for data acquisition. This software overlays the mapping of human proteins in the array list file to each array image with a fixed feature size of 130 µm (diameter). AlexaFluor<sup>®</sup> 647-conjugated goat anti-human IgG antibody printed on each subarray helps aligning the spots. Other proteins are systematically used as control spots, *e.g.*, anti-biotin antibodies which are recognized by the detection IgG antibody and the Influenza A antigen, which is recognized by approximately 95% of the total population. Scanner settings were selected such that maximal signals on the array were sub-saturated thus ensuring that the full dynamic range of the scanner was utilized.

**Data Analysis.** Data analysis was performed using Invitrogen's ProtoArray Prospector software. This software follows a 3-step process: (1) Single array analysis: for each protein on each array, a series of values are calculated including background subtracted signals, CI-P value, and replicate spot coefficient of variation; (2) Group characterization: signals for each individual protein across all samples from a given population are aligned for downstream analysis; and (3) Identification of the differences between treated and untreated sample populations. Utilizing M-statistics, proteins are identified for which the differential signals between two populations result in a significant p-value. The output from the comparative analysis includes information on the number of patients in each population that exhibited an immune response against each ProtoArray<sup>®</sup> protein that was above the M-statistic threshold established for that protein.

**Identification of Candidate Biomarkers.** All the possible two group-comparisons were performed, which led to lists of total biomarkers for each pathology, at a p-value threshold of 0.05. These lists were compared and biomarkers that were found for more than one pathology were removed from the lists in order to obtain final lists containing only specific biomarkers, *i.e.*, biomarkers unique to one of the 4 pathologies.

## Other Embodiments

Other embodiments of the invention will be apparent to those skilled in the art from a consideration of the specification or practice of the invention disclosed herein. It is intended that the specification and examples be considered as exemplary only, with the true scope of the invention being indicated by the following claims.

## Claims

What is claimed is:

14. An *in vitro* method for determining kidney status or renal transplant status in a subject, said method comprising steps of:

contacting a blood sample obtained from the subject with at least one biomarker for a time and under conditions allowing a biomarker-antibody complex to form between the at least one biomarker and an antibody present in the blood sample; and

detecting any biomarker-antibody complex formed,

wherein the at least one biomarker is selected from the group consisting of:

a set of biomarkers indicative of kidney status consisting of RAB20, OAS2, IL1RL1(3), GLRA2, SMAD3, ING4(2), CCL19, CENTD2, ECE1, LGALS3, analogs thereof and antibody-binding fragments thereof,

a set of biomarkers indicative of stable renal transplant consisting of ARPC1B, CYP2E1, CDC20, RIT1, PHF21B, RBM34, MS4A6E, C20orf132, LRRKIP1, CKLF(1), analogs thereof and antibody-binding fragments thereof,

a set of biomarkers indicative of renal transplant lomerulopathy consisting of PODN, HM13(4), TSC22D3(2), EPN1, COL23A1, GIMAP6, ZNF174, MAP3K11, CRB3(2), PRKCDBP, DCLK1, FEN1, TANK(2), GLRX5, RAB22A, MAEL, FAM71D, TTC35, analogs thereof, and antibody-binding fragments thereof, and

a set of biomarkers indicative of interstitial fibrosis and tubular atrophy consisting of IL16, MLF1, IFT81(2), DYRK2, NDFIP2, CCNE2, SNX21, TUBB2C, MUC20, ATP1A3, F11R(1), analogs thereof and antibody-binding fragments thereof.

2. Method according to claim 1, wherein the blood sample is contacted with a plurality of biomarkers for a time and under conditions allowing biomarker-antibody complexes to form between the biomarkers and antibodies present in the blood sample.

3. Method according to claim 1 or claim 2, wherein the blood sample is selected from the group consisting of whole blood, serum and plasma.
4. Method according to any one of claims 1 to 3, wherein the at least one biomarker or the plurality of biomarkers is immobilized on a solid carrier or support, preferably on an array.
5. Method according to any one of claims 1 to 4, wherein detecting the biomarker-antibody complex comprises contacting the blood sample with at least one reagent for the detection of the biomarker-antibody complex formed between the at least one biomarker and an antibody present in the blood sample.
6. Method according to any one of claims 1 to 5, wherein detecting the biomarker-antibody complex is performed by immunoassay.
7. A kit for the *in vitro* determination of kidney status or renal transplant status in a subject, the kit comprising at least one biomarker selected from the group consisting of:
  - a set of biomarkers indicative of kidney status consisting of RAB20, OAS2, IL1RL1(3), GLRA2, SMAD3, ING4(2), CCL19, CENTD2, ECE1, LGALS3, analogs thereof and antibody-binding fragments thereof,
  - a set of biomarkers indicative of stable renal transplant consisting of ARPC1B, CYP2E1, CDC20, RIT1, PHF21B, RBM34, MS4A6E, C20orf132, LRRKIP1, CKLF(1), analogs thereof and antibody-binding fragments thereof,
  - a set of biomarkers indicative of renal transplant lomerulopathy consisting of PODN, HM13(4), TSC22D3(2), EPN1, COL23A1, GIMAP6, ZNF174, MAP3K11, CRB3(2), PRKCDBP, DCLK1, FEN1, TANK(2), GLRX5, RAB22A, MAEL, FAM71D, TTC35, analogs thereof, and antibody-binding fragments thereof, and
  - a set of biomarkers indicative of interstitial fibrosis and tubular atrophy consisting of IL16, MLF1, IFT81(2), DYRK2, NDFIP2, CCNE2, SNX21, TUBB2C, MUC20, ATP1A3, F11R(1), analogs thereof and antibody-binding fragments thereof.
8. Kit according to claim 7, wherein the kit comprises a plurality of biomarkers.

9. Kit according to claim 7 or claim 8, wherein the at least one biomarker or the plurality of biomarkers is immobilized on a solid carrier or support, preferably on an array.
10. Kit according to any one of claims 7 to 9, further comprising at least one reagent for the detection of a biomarker-antibody complex formed between the at least one biomarker included in the kit and an antibody present in a blood sample obtained from a subject.
11. Kit according to claim 10, wherein the at least one reagent is a labeled anti-human antibody.
12. An array for the *in vitro* determination of kidney status or renal transplant status in a subject, the array essentially having, attached to its surface, a plurality of biomarkers selected from the group consisting of:
  - a set of biomarkers indicative of kidney status consisting of RAB20, OAS2, IL1RL1(3), GLRA2, SMAD3, ING4(2), CCL19, CENTD2, ECE1, LGALS3, analogs thereof and antibody-binding fragments thereof,
  - a set of biomarkers indicative of stable renal transplant consisting of ARPC1B, CYP2E1, CDC20, RIT1, PHF21B, RBM34, MS4A6E, C20orf132, LRRKIP1, CKLF(1), analogs thereof and antibody-binding fragments thereof,
  - a set of biomarkers indicative of renal transplant lomerulopathy consisting of PODN, HM13(4), TSC22D3(2), EPN1, COL23A1, GIMAP6, ZNF174, MAP3K11, CRB3(2), PRKCDBP, DCLK1, FEN1, TANK(2), GLRX5, RAB22A, MAEL, FAM71D, TTC35, analogs thereof, and antibody-binding fragments thereof, and
  - a set of biomarkers indicative of interstitial fibrosis and tubular atrophy consisting of IL16, MLF1, IFT81(2), DYRK2, NDFIP2, CCNE2, SNX21, TUBB2C, MUC20, ATP1A3, F11R(1), analogs thereof and antibody-binding fragments thereof.
13. Use of at least one biomarker selected from the group consisting of:
  - a set of biomarkers indicative of kidney status consisting of RAB20, OAS2, IL1RL1(3), GLRA2, SMAD3, ING4(2), CCL19, CENTD2, ECE1, LGALS3, analogs thereof and antibody-binding fragments thereof,

a set of biomarkers indicative of stable renal transplant consisting of ARPC1B, CYP2E1, CDC20, RIT1, PHF21B, RBM34, MS4A6E, C20orf132, LRRFIP1, CKLF(1), analogs thereof and antibody-binding fragments thereof,

a set of biomarkers indicative of renal transplant lomerulopathy consisting of PODN, HM13(4), TSC22D3(2), EPN1, COL23A1, GIMAP6, ZNF174, MAP3K11, CRB3(2), PRKCDBP, DCLK1, FEN1, TANK(2), GLRX5, RAB22A, MAEL, FAM71D, TTC35, analogs thereof, and antibody-binding fragments thereof, and

a set of biomarkers indicative of interstitial fibrosis and tubular atrophy consisting of IL16, MLF1, IFT81(2), DYRK2, NDFIP2, CCNE2, SNX21, TUBB2C, MUC20, ATP1A3, F11R(1), analogs thereof and antibody-binding fragments thereof,

for the *in vitro* determination of kidney status or renal transplant status in a subject.

14. Use according to claim 13, wherein the at least one biomarker comprises a plurality of biomarkers.

## **Biomarkers for the Diagnosis of Renal Allograft and Kidney Status**

### **Abstract**

The present invention relates to the identification and use of protein biomarkers with clinical relevance to kidney status and chronic renal injury or disorder. In particular, the invention provides the identity of marker proteins which are recognized by antibodies present in patients suffering from end-stage renal disorder, stable renal transplant, renal transplant lomerulopathy (TG), and interstitial fibrosis and tubular atrophy (IFTA). Methods and kits are described for using these proteins in the study and diagnosis of chronic renal transplant injury, and in the selection and/or monitoring of treatment regimens.

Patient	Graft year	time of biopsy (year after graft)	C4d	GBM duplication	IFTA	Diagnostic
1	1996	7.00	NA	+	+	TG + IFTA
2	1997	4.58	NA	+	+	TG + IFTA
3	1984	8.58	NA	-/+	+	TG + IFTA
4	1991	10.33	NA	+	+	TG + IFTA
5	2003	2.25	NA	-/+	+	TG + IFTA
6	2001	3.83	NA	+	+	TG + IFTA
7	2000	2.5	NA	+	-/+	TG
8	1999	3.25	NA	+	-/+	TG
9	1999	2.92	NA	+	-/+	TG
10	1988	15.25				TG
11	2004	2.50	+	+	-	TG
12	1995	11.75	+	+	-	TG
13	1998	8.33	+	+	-	TG
14	2006	1.42	+	+	-	TG
15	1998	9.25	+	+	-	TG
16	2004	3.25	+	+	-	TG
17	2004	0.75	+	+	-	TG
18	2004	2.58	+	+	-	TG
19	2002	3.33	+	+	-	TG
20	1998	8.50	-	-	+	IFTA
21	2005	1.00	-	-	+	IFTA
22	1986	10.83	-	-	+	IFTA
23	2005	1.16	-	-	+	IFTA
24	2005	1.00	-	-	+	IFTA
25	1997	9.91	-	-	+	IFTA
26	1996	10.00	-	-	+	IFTA
27	1994	11.92	-	-	+	IFTA
28	2002	5.08	-	-	+	IFTA
29	2001	5.00	-	-	+	IFTA
30	2006	0.92	-	-	-	STA
31	2006	1.08	-	-	-	STA
32	2006	0.66	-	-	-	STA
33	2006	0.83	-	-	-	STA
34	2006	1.33	-	-	-	STA
35	2006	1.00	-	-	-	STA

# JASN

Elevated soluble Flt1 mediates an anti-angiogenic state in patients with ANCA-associated vasculitis

Sandrine Le Roux<sup>1,2,3\*</sup>, Ruth J. Pepper<sup>4\*</sup>, Alexandre Dufay<sup>1,2,3</sup>, Mélanie Néel<sup>1,2,3</sup>, Noël Lamandé<sup>5</sup>, Marie Rimbert<sup>1,6</sup>, Régis Josien<sup>1,3,6</sup>, Mohamed Hamidou<sup>3,7</sup>, Maryvonne Hourmant<sup>1,2,3</sup>, H. Terence Cook<sup>8</sup>, Béatrice Charreau<sup>1,2,3</sup>, Etienne Larger<sup>9</sup>, Alan Salama<sup>10</sup> and Fadi Fakhouri<sup>1,2,3#</sup>.

<sup>1</sup> INSERM UMR 643, Nantes F-44000, France

<sup>2</sup> CHU Nantes, Institute of Transplantation Urology Nephrology, Nephrology Department, Nantes F-44000, France

<sup>3</sup> Université de Nantes, Faculté de Médecine, Nantes F-44000, France

<sup>4</sup> Centre for Nephrology, University College London, Royal Free Hospital, London, United Kingdom.

<sup>5</sup> INSERM 833, Collège de France, Paris, France.

<sup>6</sup> CHU de Nantes, Immunology Laboratory, Nantes F-44000 France

<sup>7</sup> CHU de Nantes, Internal medicine department, Nantes, F-44000, France

<sup>8</sup> Centre for Complement and Inflammation Research, Imperial College, London, United Kingdom.

\* contributed equally to the study and should be considered in our point of view as first co-authors

# senior co-authors

Running title: sFlt1 and ANCA vasculitis.

Word count abstract 250; text 2648.

Correspondence to:

Fadi Fakhouri: [fadi.fakhouri@univ-nantes.fr](mailto:fadi.fakhouri@univ-nantes.fr)

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

ITUN, U643, Department of Nephrology and Immunology, CHU de Nantes, Nantes, France.  
Telephone: 0033240087437 Fax: 0033240087411  
Alan Salama: [a.salama@medsch.ucl.ac.uk](mailto:a.salama@medsch.ucl.ac.uk)

For Peer Review

1  
2  
3 Abstract  
4  
5

6 Anti-neutrophil cytoplasm antibody-associated vasculitides (AAV) represent a group of  
7 necrotizing small vessel vasculitides that include Wegener's granulomatosis, microscopic  
8 polyangiitis and Churg-Strauss-Syndrome. To date, little is known regarding endothelial cell  
9 survival and vessel regeneration in patients with AAV, despite the increasingly recognised  
10 role of vascular endothelial growth factor (VEGF) in mediating vessel repair. In the present  
11 study, we show that serum levels of soluble Flt1 (sFlt1), a potent inhibitor of VEGF, are  
12 significantly increased during the acute phase of PR3-AAV ( $2592 \pm 11347$  pg/ml) and MPO-  
13 AAV ( $476 \pm 4258$  pg/ml) compared to controls ( $118 \pm 269$  pg/ml). sFlt1 levels decreased  
14 during disease remission but remained increased compared to controls in patients with PR3-  
15 AAV. sFlt1 serum levels correlated with serum levels of C5a, an anaphylatoxin released  
16 following complement activation. Serum from patients with acute PR3-AAV induced the  
17 release of sFlt1 by human monocytes in vitro, but failed to induce a similar effect on  
18 endothelial cells. Pre-treatment of monocytes with an anti-C5a receptor blocking antibody  
19 attenuated sFlt1 release. Serum from patients with acute AAV induced a disruption of blood  
20 flow in the chicken chorioallantoic membrane assay and this effect was prevented by  
21 incubating patients' serum with an excess of human VEGF. Our data indicate that a  
22 complement mediated-increase in sFlt1 occurs during acute AAV which leads to an "anti-  
23 angiogenic" state that hinders endothelial repair. "Pro-angiogenic" therapies, which would  
24 include complement activation inhibitors, may enhance endothelial repair during AAV and  
25 thus reduce renal vascular scarring and ultimately the risk of end-stage renal disease.  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

1  
2  
3  
4

### Introduction

5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

Anti-neutrophil cytoplasm antibody (ANCA)-associated vasculitides (AAV) represent a group of necrotizing small vessel vasculitides that include Wegener's granulomatosis (WG), microscopic polyangiitis (MPA) and Churg-Strauss-Syndrome (CSS). Frequent manifestations of AAV are crescentic glomerulonephritis and alveolar haemorrhage both due to necrotizing capillaritis. AAV are characterised by the presence of autoantibodies directed against neutrophil antigens, specifically myeloperoxidase (MPO) and proteinase-3 (PR-3)(termed MPO-ANCA and PR3-ANCA respectively) with a novel ANCA autoantigen, lysosomal membrane associated protein-2 (LAMP2), recently having been described [1, 2]. Accumulating data have demonstrated the pathogenic role of ANCA *in vivo* and *in vitro*, in priming neutrophils and initiating endothelial damage. *In vitro*, ANCA activate neutrophils [3]- and monocytes [4]- promoting their degranulation, respiratory burst [5] and stimulating upregulation of adhesion molecules which lead to their augmented endothelial rolling, adhesion and cell transmigration [6, 7]. *In vivo*, immunization of MPO-deficient mice with murine MPO leads to the development of MPO-ANCA which are sufficient to passively transfer disease to naïve recipients, with the development of necrotizing renal and pulmonary vasculitis [8]. In a distinct autoimmune animal model, susceptible rats immunised with human MPO develop vasculitis, pulmonary capillaritis and focal necrotising glomerulonephritis in association with MPO-ANCA [9]. Finally, in patients, pathogenicity of MPO-ANCA has been demonstrated following trans-placental transfer of anti-MPO antibodies to a newborn, in a single case report [10].

ANCA through their activation of circulating leukocytes and the release of various proteases ultimately cause endothelial damage, and the number of detached apoptotic endothelial cells in the circulation appears to correlate with disease activity in patients with AAV [11]. Moreover, the number of circulating CD34<sup>+</sup> hematopoietic progenitor cells and to a lesser

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

extent, endothelial progenitor cells, which may contribute to the repair of damaged microvasculature, tend to increase during the remission phases of AAV [12] [13]. To date, despite increased understanding of angiogenesis and the critical role of vascular endothelial growth factor (VEGF) in mediating vessel repair, little is known regarding regulation of endothelial cell survival and vessel regeneration in patients with AAV.

VEGF is the most potent growth factor for endothelial cells, promoting endothelial cell proliferation, neovasculogenesis and preventing endothelial cell apoptosis. There are various isoforms of VEGF which result from alternative splicing, the most important isoforms in humans being VEGF 121 and 167 [14, 15]. Similarly, several types of receptors for VEGF have been identified, the two main ones being VEGF-R1 and -R2. A circulating form of VEGF-R1, soluble Flt1 (sFlt1), lacking the transmembrane domain of the intact protein, results from an alternative splicing of VEGF-R1. It is mainly secreted by monocytes [16, 17], endothelial cells and placental cytotrophoblasts [18] and displays potent inhibitory effects on VEGF. Elevated levels of sFlt1 lead to functional VEGF deficiency, and promote an effective "anti-angiogenic state", which can be of significant clinical importance, as demonstrated by the association of elevated serum sFlt1 levels with placental vascular dysfunction and preeclampsia [19, 20]. Moreover, there is a close association between sFlt1 production and inflammation, demonstrated in a murine model of repeated fetal loss, in which sFlt1 release was promoted through complement activation, specifically the anaphylatoxin C5a [21]. A more recent study using a murine model of retinopathy of prematurity has underlined the link between C5a and angiogenesis, through the augmented secretion of sFlt1 by monocytes [22]. In the present study, we aimed to assess the role of sFlt1 in patients with AAV, diseases characterised by monocyte activation and in which alternative complement components have been implicated in their pathophysiology. We measured serum levels of sFlt1 in AAV patients

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

at different disease points and investigated whether increased sFlt1 leads to an effective anti-angiogenic state in these patients.

For Peer Review

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

Results.

For Peer Review

1  
2  
3  
4

### *Circulating Flt1 levels*

5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25

Circulating sFlt1 levels were significantly increased during the acute phase of AAV in those with PR3-ANCA ( $2592 \pm 11347$  pg/ml) and MPO-ANCA ( $476 \pm 4258$  pg/ml) compared to controls ( $118 \pm 269$  pg/ml) (PR3-ANCA versus controls  $p < 0.0001$ ; MPO-ANCA versus controls  $p < 0.001$ ) and to haemodialysis patients ( $214 \pm 71$ ) (PR3-ANCA versus HD controls  $p < 0.001$ ) (Figure 1). sFlt1 levels in patients with anti-GBM disease patients was not significantly different from controls ( $353 \pm 2628$  pg/ml,  $p=0.054$ ). sFlt1 levels decreased significantly during disease remission in those with PR3-ANCA ( $239 \pm 534$  pg/ml) and MPO-ANCA ( $154 \pm 243$  pg/ml) but remained increased compared to controls only in patients with PR3-ANCA.

26  
27  
28  
29  
30  
31  
32

In eighteen patients with paired sFlt1 measurements, there was a significant decrease in sFlt1 between the onset of disease and remission at three months of follow-up (Figure 2A) ( $p = 0.0026$ , paired t test).

33  
34  
35

### *Serum C5a levels*

36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47

Serum C5a levels were found to be significantly elevated in acute PR3- (290% of normal) and MPO-AAV (180% of normal) samples compared to healthy controls and the paired remission PR3- and MPO-AAV samples ( $p=0.001$ , one way ANOVA) (Figure 2B). Moreover, C5a levels correlated with levels of sFlt1 ( $r^2=0.337$ ,  $p=0.026$ , One tailed Spearman rank).

48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

### *Effect of serum on sFlt1 secretion by human monocytes in vitro*

TNF per se did not alter sFlt1 secretion by monocytes. After two hours incubation with serum from acute PR3-AAV patients, human monocytes increased sFlt1 secretion compared to serum obtained during disease remission or from healthy controls (figure 3A) ( $p < 0.0003$ ). Serum obtained during PR3-AAV remission did not significantly increase sFlt1 secretion by

monocytes compared to control serum ( $p>0.05$ ). Pre-treatment of monocytes with anti-C5aR inhibitory antibody significantly blunted sFlt1 release by monocytes after incubation with serum from patients with acute PR3-AAV ( $p<0.0003$ ).

*Effect of C5a and anti-PR3 monoclonal antibody on sFlt1 secretion by monocytes in vitro.*

Next, we aimed to assess whether sFlt1 secretion by monocytes was driven by the complement anaphylatoxin, C5a or by anti-PR3 monoclonal antibody.

C5a (10 nM) alone did not induce sFlt1 secretion by monocytes in vitro after 2 hours of incubation (figure 3B). Similarly, no sFlt1 secretion was detected after the incubation of monocytes with purified anti-PR3 monoclonal antibody (10  $\mu$ g/ml) for 2 hours (data not shown) or 16 hours (figure 3B). However, preincubation of monocytes with anti-PR3 monoclonal antibody (10  $\mu$ g/ml) for 16 hours followed by incubation with C5a (10 nM) for 2 hours led to significant release of sFlt1 by monocytes (figure 3B).

*C5aR expression on human monocytes and HUVEC in vitro*

C5aR was detected at the surface of human monocytes at baseline and after incubation (16 h) with anti-PR3 monoclonal antibody. Neither anti-PR3 monoclonal antibody (figure 3C) nor acute AAV patients' sera (data not shown) altered the level of C5aR expression on monocytes in vitro (figure 3C). No significant C5aR expression was detected at the surface of HUVEC in vitro at baseline or after incubation (16 h) of HUVEC with anti-PR3 monoclonal antibody (data not shown).

*Effect of serum on sFlt1 secretion by HUVEC in vitro*

HUVEC constitutively secrete sFlt1 in vitro (figure 4A). Incubation for two hours with serum from PR3-AAV patients drawn during acute disease or remission, or an anti-PR3 monoclonal

1

2

3

4

5

6

7

8

9

10

11

12

13

14

15

16

17

18

19

20

21

22

23

24

25

26

27

28

29

30

31

32

33

34

35

36

37

38

39

40

41

42

43

44

45

46

47

48

49

50

51

52

53

54

55

56

57

58

59

60

antibody or of recombinant human C5a did not significantly increase sFlt1 secretion by HUVEC in vitro compared to control serum ( $p > 0.05$  figure 4A). A similar pattern of results was obtained following a 16-h incubation with serum, anti-PR3 monoclonal antibodies or C5a (figure 4B).

#### CAM assay

Next we aimed to determine whether the increase in sFlt1 serum levels in AAV patients leads to an antiangiogenic state, using the CAM assay, a well-established model of angiogenesis.

Serum from patients with acute PR3-AAV ( $n=5$ ) displayed a clear effect in the CAM assay, with early disruption of blood flow (figure 5 A-B). The effect was detected as early as 1 hour after serum was laid upon the CAM and was maximal at 3 hours. PBS and serum from healthy controls ( $n=5$ ) had no effect in the CAM assay (figure 5 C-D).

Serum from one patient with acute PR3-AAV was filtered using a semipermeable membrane with a cut-off of 10 Kd. The filtrate, containing molecules of molecular weight  $< 10$  Kd did not display any effect in the CAM assay whereas the concentrate, containing molecules of a molecular weight  $> 10$  Kd (which would include sFlt1) had the same effect as un-separated serum on CAM microvasculature (figure 5 E-F). Serum from patients with acute PR3-AAV ( $n=2$ ) were tested in the CAM model with and without prior incubation (2h at 37°C) with an excess of recombinant human VEGF. Preincubation of patients' serum with VEGF reversed the effect of the serum in the CAM assay (figure 5 G-H).

1  
2  
3  
4

## Discussion

5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30

The pathological hallmark of AAV is an intense necrotizing capillaritis. Treatment of patients with AAV is aimed at suppressing cellular and humoral mediated damage, through the use of corticosteroids, immunosuppressive drugs and in more severe cases, with additional plasma exchange [23-26]. Currently, we do not specifically target endothelial damage or promote vascular repair. However, despite intense treatment the initial endothelial insult can lead to chronic vascular damage that translates into irreversible organ damage, most importantly chronic kidney disease. In a recent study, one out of four patients with AAV and renal involvement reached end stage renal disease which was due, in almost half the cases, to the progression of chronic renal scars without active vasculitis [27]. These findings suggest that endothelial cell survival and neo-vasculogenesis during the acute phase of AAV are probably crucial for the avoidance of long-term organ failure.

31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

The present study, the first to address the issue of anti-angiogenic factors in AAV, clearly demonstrates that an increase in serum anti-angiogenic factors occurs during the acute phase of AAV. Circulating levels of sFlt1, a potent VEGF inhibitor, were significantly increased during the acute phases of AAV and this increase was most marked in patients with PR3-ANCA. The more chronic lesions seen in MPO-AAV, associated with more scarring at presentation [28], may suggest that the peak effect in MPO-AAV may have preceded the clinical presentation. sFlt1 serum levels were also increased in another form of antibody-mediated renal capillaritis, anti-GBM disease, even though the difference compared to controls did not reach statistical significance, most probably due to the limited number of anti-GBM disease patients included in the study. However, this finding suggests that an increase in sFlt1 release, and hence a possible "anti-angiogenic state", may occur in various disorders which primarily target the vasculature, and are mediated through monocyte/macrophage effectors.

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21

Sera from patients with acute PR3-AAV displayed a rapid (as early as 1 hour) and very significant effect in the CAM assay, a well-established model of angiogenesis. Deposition of sera from patients with acute PR3-AAV led to the near-complete disruption of the microvasculature in the treated area of the CAM. This effect was dependent on proteins with high-molecular weight (>10 Kd) and was completely reversed by the addition on an excess of human VEGF. CAM microvasculature integrity is highly dependent on VEGF as underlined by previous studies with a VEGF receptor tyrosine kinase inhibitor or with avastin, an anti-VEGF antibody [29,30].

22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

sFlt1 is primarily secreted by monocytes, endothelial cells (and placental cells). Both endothelial cells and monocytes are critical players in the pathogenic events leading to clinical AAV. For instance, in kidney biopsies from patients with acute AAV, monocytes and not neutrophils, constitute the dominant glomerular-infiltrating cells, and their number correlate with the degree of glomerular necrosis, crescents and renal function at the time of renal biopsy [31]. Monocytes express both ANCA autoantigens, MPO and PR3, and the expression of the latter is increased in patients with AAV [32-34]. As such, monocytes are a target for ANCA. Priming of monocytes by anti-PR3 antibodies has been well documented in previous studies [35]. Anti-PR3 antibodies usually have a variable direct impact on the secretion by monocytes of various cytokines, such as IL-6, IL-8 and TNF $\alpha$ . However, ANCA can amplify the production of cytokines by monocytes following stimulation with various agents, such as bacterial lipopolysaccharide (LPS). This indirect effect of ANCA is mediated through the induction by ANCA of several receptors to bacterial peptides on monocytes surface, including CD14 and Toll-Like receptors [4, 36].

Our findings suggest that the primary source of sFlt1 in patients with AAV is the monocytes and not endothelial cells. Serum from patients with acute PR3-AAV induced the release of sFlt1 by human monocytes in vitro but had no effect on the secretion of the latter by HUVEC.

This induction of sFlt1 secretion by monocytes does not solely depend on ANCA, as a monoclonal anti-PR3 antibody does not induce sFlt1 secretion, but is mediated through cooperation with C5a, a complement cascade activation anaphylatoxin. Our data clearly demonstrate that anti-PR3 mAb is required for the priming of monocytes, as a prerequisite for the secretion of sFlt1 upon stimulation with C5a. Monocyte priming by anti-PR3 antibodies does not depend on an upregulation of the expression of C5a receptor on the surface of monocytes (figure 3C) but may involve transactivation of the C5a receptor and its intracellular signalling pathways. In keeping with this, HUVEC did not express C5aR constitutively (also documented previously) or following stimulation with anti-PR3 monoclonal antibody, which may account for the absence of sFlt1 secretion by HUVEC upon stimulation with AAV sera or exogenous C5a. However, differences exist between HUVEC and microvascular endothelial cells (in the kidney and lung) and we can not exclude the possibility that, *in vivo*, microvascular endothelial cells express C5aR which may contribute to the increased sFlt1 found in patients with AAV.

The critical role of C5a in mediating secretion of sFlt1 by monocytes, is an additional illustration of the potential pathogenic role of complement in AAV. Complement, a central part of the innate immune response, is a complex proteic cascade that can be activated through three distinct pathways, the classical, the lectin and the alternative pathways. The three pathways, differ with regard to their triggering factors, but converge at the generation of C3 and C5 convertases [37]. The latter cleaves C5 and generates C5a, a proinflammatory anaphylatoxin and C5b that mediates the formation of the C5b-C9 terminal membrane attack complex (MAC) which induces lytic lesions in targeted cell membranes. Complement alternative pathway is in a state of continuous low-level activation that can be amplified and self-sustained through an amplification loop involving the C3 convertase (C3bBb). The latter

is tightly regulated by three major circulating and/or membrane inhibitory factors: factor H, factor I and membrane co-factor protein (MCP) [38].

Recent experimental data have underlined the importance of the complement alternative pathway in the genesis of AAV. C5-/-, C5a Receptor -/- and Factor B-/- mice, but not C4-/- mice, are protected from induction of AAV, in a murine passive transfer model using anti-MPO antibodies [39]. ANCA-primed neutrophils have been found to release an as yet unidentified factor(s) that activates complement and releases C3a and C5a [40]. C5a, in turn, primes neutrophils for ANCA-mediated oxidative burst. Our results show that complement activation, in the form of C5a, is the major trigger for sFlt1 secretion by ANCA primed monocytes. Thus, besides its role in the amplification of endothelial inflammatory lesions during AAV, complement activation induces an increase in the anti-angiogenic factor, sFlt1, which hinders endothelial cell repair in this setting. The occurrence of such an anti-“angiogenic state” in patients with AAV is corroborated by our data in the CAM model (figure 5).

The present study provides the first evidence of an increase of a potent anti-angiogenic factor, sFlt1, and the occurrence of an “anti-angiogenic state” in the setting of acute vasculitis affecting the renal microvasculature. Our data also indicate that sFlt1 may prove a helpful marker of AAV activity, while most importantly, anti-sFlt1 targeted therapies may be of benefit in the setting of acute disorders affecting the renal microvasculature. Reversing an “anti-angiogenic state” or promoting a more “pro-angiogenic state” may help enhance endothelial cell survival and repair and thus reduce renal vascular scars and ultimately the risk of progression towards ESRD. Finally, inhibitors of complement activation, such as eculizumab, a monoclonal anti-C5 antibody that blocks the generation of C5a [41], may prove to be an effective additional treatment for AAV. Blocking the release of C5a may halt ANCA-mediated endothelial injury and also enhance vascular repair in patients with AAV.

1  
2  
3 Concise Methods  
4  
5

6 *Patients and serum analysis*

7 Serum samples were available for 40 patients with PR3-AAV during active disease (n=20) or  
8 during remission (n=20) and 23 patients with MPO-AAV during active disease (n=10) or  
9 during remission (n=13). Eighteen additional patients with PR3-AAV had paired serum  
10 samples drawn at the onset of the disease and at three months of follow-up.  
11

12 Seventy-nine percents of patients had renal involvement, defined by microscopic hematuria  
13 and proteinuria and/or elevated levels of serum creatinine and/or a kidney biopsy  
14 demonstrating focal necrotising glomerulonephritis, typical features of AAV. The remaining  
15 patients had predominantly pulmonary or ear/nose/throat involvement.  
16

17 We also included as controls 11 patients with acute anti-glomerular basement membrane  
18 (GBM) disease, 10 patients with end-stage renal disease undergoing haemodialysis and 18  
19 healthy controls. Patients were venesected as soon as the diagnosis of AAV or anti-GBM  
20 disease was confirmed and before the start of treatment where possible.  
21

22 WG and MPA were diagnosed according to the Chapel Hill Consensus conference criteria  
23 [42]. Anti-GBM disease was defined by the presence of rapidly progressive crescentic  
24 glomerulonephritis documented by renal biopsy and/or alveolar haemorrhage and the  
25 presence of circulating anti-GBM antibodies by ELISA.  
26

27 Glomerular filtration rate (eGFR) was estimated using the MDRD simplified formula [43].  
28 Circulating F1t1 and C5a levels were assayed using commercial ELISA kits according to the  
29 manufacturer's instructions (R & D systems, Minneapolis, USA).  
30

31  
32  
33 *Human monocytes and Human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) culture*  
34

35 Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were extracted from blood using Ficoll (Eurobio,  
36 Les Ulis, France) and directly frozen in trizol® at -80 °C. Monocytes were isolated using  
37 elutriation and were resuspended in RPMI and supplemented with 1% FCS. 500 µl were  
38

added to each well of 24-well tissue-culture plates at a final concentration of  $10^6$  cells/ml and incubated at 37°C in a 5% CO<sub>2</sub>-humidified atmosphere. HUVEC (Lonza, Cologne, Germany) were cultured using Bsal medium and supplement kit (Promocell, Heidelberg, Germany). Cells were used between the 3<sup>rd</sup> and 5<sup>th</sup> passage.

After stimulation for 30 min with TNF- $\alpha$  (2 ng/ml) monocytes or HUVEC were incubated with one of :

- 1) serum (10%) obtained from patients with PR3-AAV during an acute phase (n=3) or remission (n=3), or healthy donors (n=3) for 2 hours. These experiments were conducted with or without pre-treatment of monocytes and HUVEC with an anti-C5a human receptor (C5aR) monoclonal antibody (10  $\mu$ g/ml) (R & D systems, Minneapolis, USA) for 30 minutes.
- 2) a monoclonal murine anti-human PR3 antibody (clone 12.8) (10  $\mu$ g/ml)(Research Diagnostics, MA, USA) or with equal amounts of isotype-matched murine IgG for 16 hours.
- 3) purified C5a 10 nM (R & D systems, Minneapolis, USA).

Cells supernatants were harvested, cells debris were removed by centrifugation and samples were stored at -20°C until further processing. In order to take into account the sFit1 already present in the patients' sera, sFit1 levels were measured in the diluted patients' sera (10%) used in this set of experiments, following 2 hour incubation at 37°C in a 5% CO<sub>2</sub>-humidified atmosphere, in the absence of monocytes or HUVEC.

#### *Analysis of C5aR expression on monocytes and HUVEC*

C5aR expression on monocytes and HUVEC was assessed by flow cytometry using a mouse anti-human C5aR (R & D systems, Minneapolis, USA) and a FITC-conjugated donkey anti-mouse IgG antibody (Jackson Immunoresearch, PA, USA).

#### *Chick chorioallantoic membrane (CAM) assay*

1  
2  
3 Patients' serum from PR3-AAV in an acute phase (n=5) or healthy controls (n=5) was  
4 assessed using the CAM assay, as previously described [17]. CAM tests were also performed  
5 using the same PR3-AAV serum that was preincubated with an excess of human recombinant  
6 VEGF (0.5 ng of VEGF/ml of serum) (Clonetics, Lonza, Basel, Switzerland) for 30 minutes  
7 (n=2). In further experiments serum from the same PR3-AAV patients were filtered through a  
8 semi permeable membrane with a filtration cut-off of 10 Kd (Biomax-10 Millipore, Billerica,  
9 MA). Both the concentrate and the filtrate were tested in the CAM assay.  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25

All experiments were performed in 3-6 eggs, at day 9 postincubation, and replicated at least twice on separate occasions. Each egg received both patients' serum and PBS on 2 separate zones of the CAM.

#### 26 27 28 Statistics

29 Data were analysed using a one way ANOVA, paired t test and Spearman rank correlation  
30 using Prism software v4 (GraphPad, Ca, USA).

#### 31 32 33 Acknowledgments

34 This study was supported by a grant from La Région Pays de la Loire.

35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
The authors have no competing financial interests to declare.

## References

1. Salama, A.D. and C.D. Pusey, *Shining a LAMP on pauci-immune focal segmental glomerulonephritis*. Kidney Int, 2009. **76**(1): p. 15-7.
2. Kain, R., et al., *Molecular mimicry in pauci-immune focal necrotizing glomerulonephritis*. Nat Med, 2008. **14**(10): p. 1088-96.
3. van Rossum, A.P., et al., *Constitutive membrane expression of proteinase 3 (PR3) and neutrophil activation by anti-PR3 antibodies*. J Leukoc Biol, 2004. **76**(6): p. 1162-70.
4. Nowack, R., et al., *Upregulation of CD14 and CD18 on monocytes In vitro by antineutrophil cytoplasmic autoantibodies*. J Am Soc Nephrol, 2000. **11**(9): p. 1639-46.
5. Radford, D.J., J.M. Lord, and C.O. Savage, *The activation of the neutrophil respiratory burst by anti-neutrophil cytoplasmic autoantibody (ANCA) from patients with systemic vasculitis requires tyrosine kinases and protein kinase C activation*. Clin Exp Immunol, 1999. **118**(1): p. 171-9.
6. Little, M.A., et al., *Antineutrophil cytoplasm antibodies directed against myeloperoxidase augment leukocyte-microvascular interactions in vivo*. Blood, 2005. **106**(6): p. 2050-8.
7. Pankhurst, T., C.O. Savage, and M.A. Little, *Review article: Leukocyte-endothelial dysregulation in systemic small vessel vasculitis*. Nephrology (Carlton), 2009. **14**(1): p. 3-10.
8. Xiao, H., et al., *Antineutrophil cytoplasmic autoantibodies specific for myeloperoxidase cause glomerulonephritis and vasculitis in mice*. J Clin Invest, 2002. **110**(7): p. 955-63.
9. Little, M.A., et al., *Experimental autoimmune vasculitis: an animal model of anti-neutrophil cytoplasmic antibody-associated systemic vasculitis*. Am J Pathol, 2009. **174**(4): p. 1212-20.
10. Schlieben, D.J., et al., *Pulmonary-renal syndrome in a newborn with placental transmission of ANCA*. Am J Kidney Dis, 2005. **45**(4): p. 758-61.
11. Woywodt, A., et al., *Circulating endothelial cells as markers for ANCA-associated small-vessel vasculitis*. Lancet, 2003. **361**(9353): p. 206-10.
12. de Groot, K., et al., *Vascular endothelial damage and repair in antineutrophil cytoplasmic antibody-associated vasculitis*. Arthritis Rheum, 2007. **56**(11): p. 3847-53.
13. Zavada, J., et al., *Reduced number of endothelial progenitor cells is predictive of early relapse in anti-neutrophil cytoplasmic antibody-associated vasculitis*. Rheumatology (Oxford), 2009. **48**(10): p. 1197-201.
14. Paleolog, E.M., *Angiogenesis in rheumatoid arthritis*. Arthritis Res, 2002. **4 Suppl 3**: p. S81-90.
15. Ferrara, N., H.P. Gerber, and J. LeCouter, *The biology of VEGF and its receptors*. Nat Med, 2003. **9**(6): p. 669-76.
16. Kishuku, M., et al., *Expression of soluble vascular endothelial growth factor receptor-1 in human monocyte-derived mature dendritic cells contributes to their angiogenic property*. J Immunol, 2009. **183**(12): p. 8176-85.
17. Di Marco, G.S., et al., *The soluble VEGF receptor sFlt1 contributes to endothelial dysfunction in CKD*. J Am Soc Nephrol, 2009. **20**(10): p. 2235-45.
18. Gu, Y., D.F. Lewis, and Y. Wang, *Placental productions and expressions of soluble endoglin, soluble flt1-like tyrosine kinase receptor-1, and placental growth factor in normal and preeclamptic pregnancies*. J Clin Endocrinol Metab, 2008. **93**(1): p. 260-6.

- 1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60
19. Levine, R.J., et al., *Soluble endoglin and other circulating antiangiogenic factors in preeclampsia*. N Engl J Med, 2006. **355**(10): p. 992-1005.
  20. Venkatesha, S., et al., *Soluble endoglin contributes to the pathogenesis of preeclampsia*. Nat Med, 2006. **12**(6): p. 642-9.
  21. Girardi, G., et al., *Complement activation induces dysregulation of angiogenic factors and causes fetal rejection and growth restriction*. J Exp Med, 2006. **203**(9): p. 2165-75.
  22. Langet, H.F., et al., *Complement-mediated inhibition of neovascularization reveals a point of convergence between innate immunity and angiogenesis*. Blood.
  23. Hamour, S., A.D. Salama, and C.D. Pusey, *Management of ANCA-associated vasculitis: Current trends and future prospects*. Ther Clin Risk Manag, **6**: p. 253-64.
  24. Jones, R.B., et al., *Rituximab versus cyclophosphamide in ANCA-associated renal vasculitis*. N Engl J Med, **363**(3): p. 211-20.
  25. Jose, R.J., et al., *Rituximab for rescue and maintenance therapy in rapidly progressive life-threatening antineutrophil cytoplasmic autoantibody-associated systemic vasculitis*. Scand J Urol Nephrol.
  26. Jayne, D.R., et al., *Randomized trial of plasma exchange or high-dose methylprednisolone as adjunctive therapy for severe renal vasculitis*. J Am Soc Nephrol, 2007. **18**(7): p. 2180-8.
  27. Kamali, S., et al., *Predictors of damage and survival in patients with Wegener's granulomatosis: analysis of 50 patients*. J Rheumatol, **37**(2): p. 374-8.
  28. Hauer, H.A., et al., *Renal histology in ANCA-associated vasculitis: differences between diagnostic and serologic subgroups*. Kidney Int, 2002. **61**(1): p. 80-9.
  29. Di Marco, G.S., et al., *Angiogenesis and diabetes: different responses to pro-angiogenic factors in the chorioallantoic membrane assay*. Mol Med, 2008. **14**(11-12): p. 705-14.
  30. Ledoux, S., et al., *Angiogenesis associated with visceral and subcutaneous adipose tissue in severe human obesity*. Diabetes, 2008. **57**(12): p. 3247-57.
  31. Weidner, S., et al., *Histologic analysis of renal leukocyte infiltration in antineutrophil cytoplasmic antibody-associated vasculitis: importance of monocyte and neutrophil infiltration in tissue damage*. Arthritis Rheum, 2004. **50**(11): p. 3651-7.
  32. Muller Kobold, A.C., C.G. Kallenberg, and J.W. Tervaert, *Leucocyte membrane expression of proteinase 3 correlates with disease activity in patients with Wegener's granulomatosis*. Br J Rheumatol, 1998. **37**(8): p. 901-7.
  33. Hattar, K., et al., *Anti-proteinase 3 antibodies (c-ANCA) prime CD14-dependent leukocyte activation*. J Leukoc Biol, 2005. **78**(4): p. 992-1000.
  34. Ohlsson, S., et al., *Increased monocyte transcription of the proteinase 3 gene in small vessel vasculitis*. Clin Exp Immunol, 2005. **141**(1): p. 174-82.
  35. Weidner, S., et al., *Antineutrophil cytoplasmic antibodies induce human monocytes to produce oxygen radicals in vitro*. Arthritis Rheum, 2001. **44**(7): p. 1698-706.
  36. Uehara, A., et al., *Antibodies to proteinase 3 prime human monocytic cells via protease-activated receptor-2 and NF-kappaB for Toll-like receptor- and NOD-dependent activation*. Mol Immunol, 2007. **44**(14): p. 3552-62.
  37. Walport, M.J., *Complement. First of two parts*. N Engl J Med, 2001. **344**(14): p. 1058-66.
  38. Fakhouri, F. and V. Fremeaux-Bacchi, *Does hemolytic uremic syndrome differ from thrombotic thrombocytopenic purpura?* Nat Clin Pract Nephrol, 2007. **3**(12): p. 679-87.

- 1  
2  
3 39. Xiao, H., et al., *Alternative complement pathway in the pathogenesis of disease*  
4 *mediated by anti-neutrophil cytoplasmic autoantibodies.* Am J Pathol, 2007. **170**(1): p.  
5 52-64.  
6 40. Schreiber, A., et al., *C5a receptor mediates neutrophil activation and ANCA-induced*  
7 *glomerulonephritis.* J Am Soc Nephrol, 2009. **20**(2): p. 289-98.  
8 41. Parker, C., *Eculizumab for paroxysmal nocturnal haemoglobinuria.* Lancet, 2009.  
9 **373**(9665): p. 759-67.  
10 42. Jennette, J.C., et al., *Nomenclature of systemic vasculitides. Proposal of an*  
11 *international consensus conference.* Arthritis Rheum, 1994. **37**(2): p. 187-92.  
12 43. Levey, A.S., et al., *A more accurate method to estimate glomerular filtration rate from*  
13 *serum creatinine: a new prediction equation. Modification of Diet in Renal Disease*  
14 *Study Group.* Ann Intern Med, 1999. **130**(6): p. 461-70.
- 15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

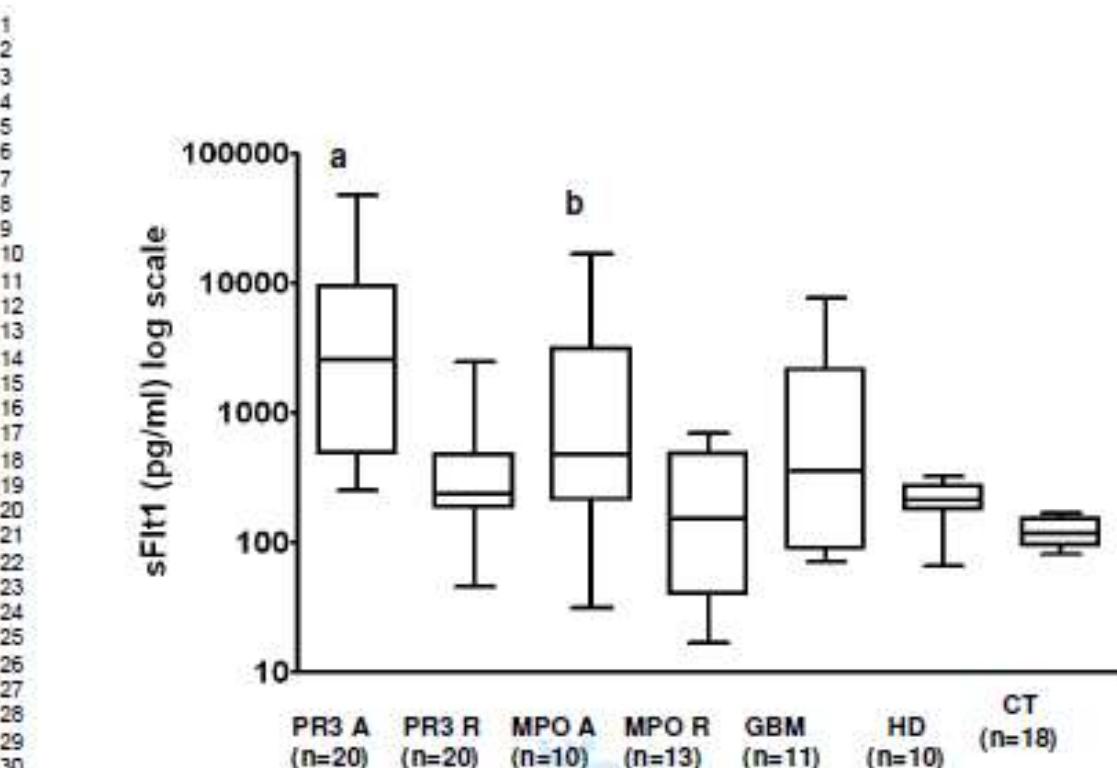
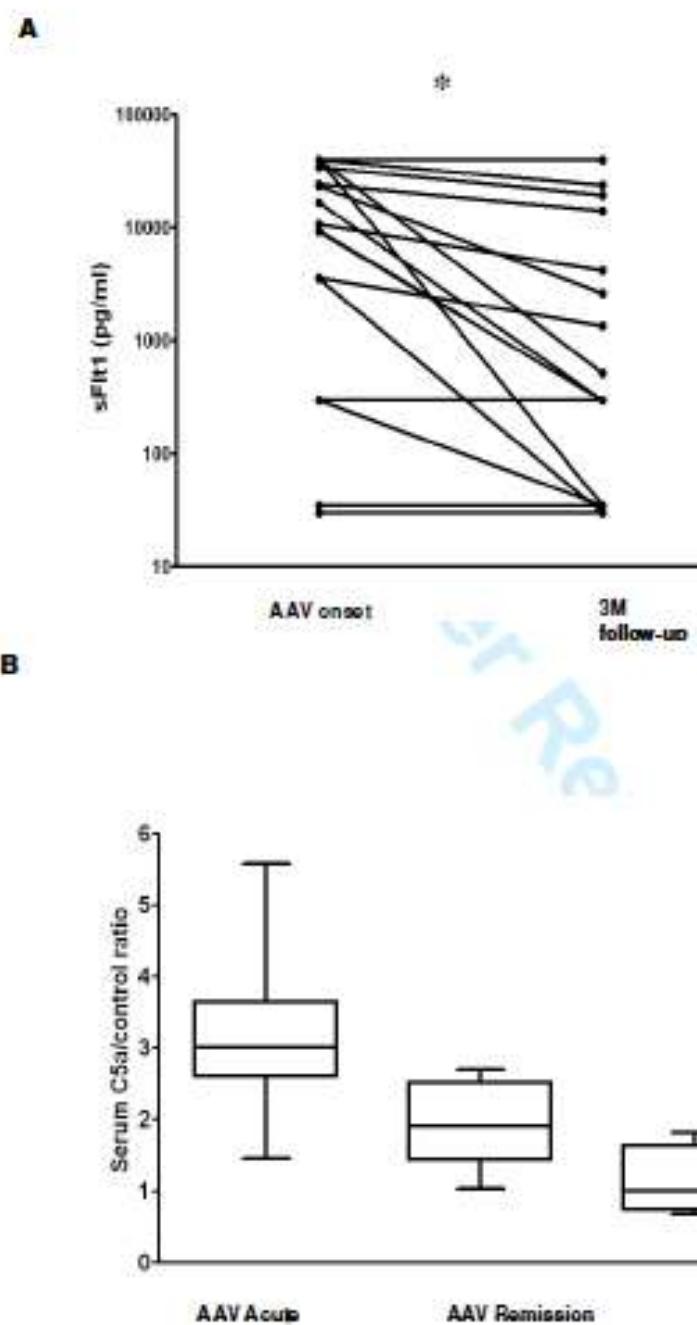


Figure 1: Serum sFlt1 levels in patients with PR3 and MPO-associated vasculitis during acute disease (A) or during disease remission (R), in patients with anti-glomerular basement membrane (GBM) disease, in hemodialysis patients (HD) and healthy controls(CT).

a:  $p < 0.0001$  for PR3 A versus CT and  $p < 0.001$  for PR3 A versus PR3 R, MPO R and HD.

b:  $p < 0.001$  for MPO A versus CT



1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

Figure 2:

A) Serum sFlt1 levels (log scale) in 18 patients with PR3-associated vasculitis at the onset of the disease and at three-month follow-up.

\* p = 0.0026, paired t test.

B) Serum C5a levels in acute and remission AAV samples and from healthy controls demonstrating significantly elevated levels in acute disease compared to disease remission and those found in healthy controls (p=0.001 for AAV acute versus AAV remission and controls).

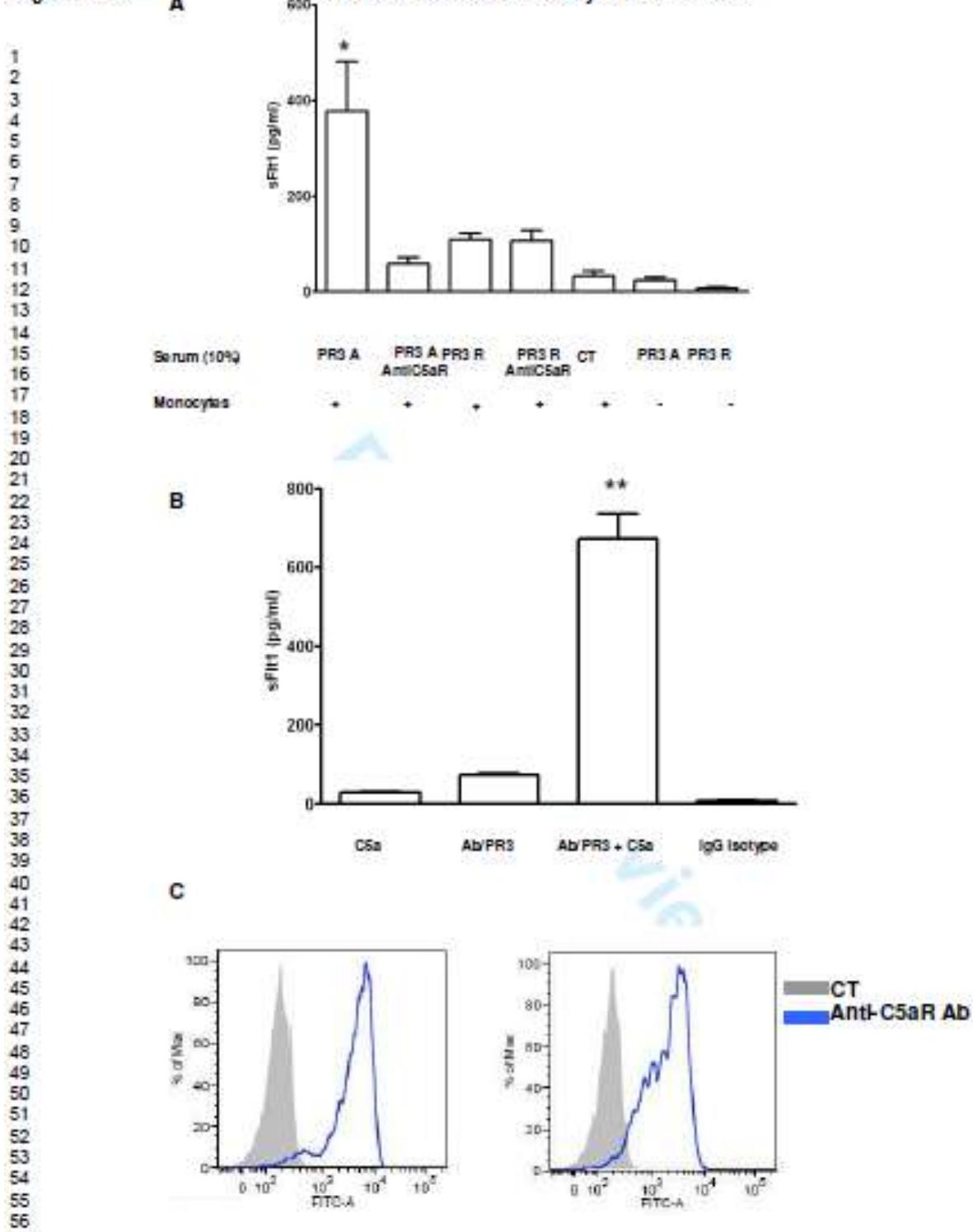


Figure 3:

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11

A- Serum (10%) from patients with acute PR3-associated vasculitis induced an increase in sFlt1 secretion by human monocytes in vitro (2h incubation). sFlt1 secretion was blunted when monocytes were pre-incubated with an inhibitory anti-C5a receptor antibody. \* p < 0.0003 versus all other groups.

12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21

B- Incubation of human monocytes in vitro with a murine anti-human PR3 monoclonal antibody for 16 hours and subsequently with human C5a (10 nM) induced sFlt1 secretion by monocytes. Incubation of monocytes with anti-PR3 antibody or C5a (2h) failed to induce sFlt1 secretion. \*\* p < 0.0001 versus all other groups.

22  
23  
24  
25  
26  
27  
28

C- FACS analysis of the expression of C5a receptor on monocytes surface before (left panel) and after (right panel) incubation of monocytes with a murine anti-PR3 monoclonal antibody (10 µg/ml).

29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

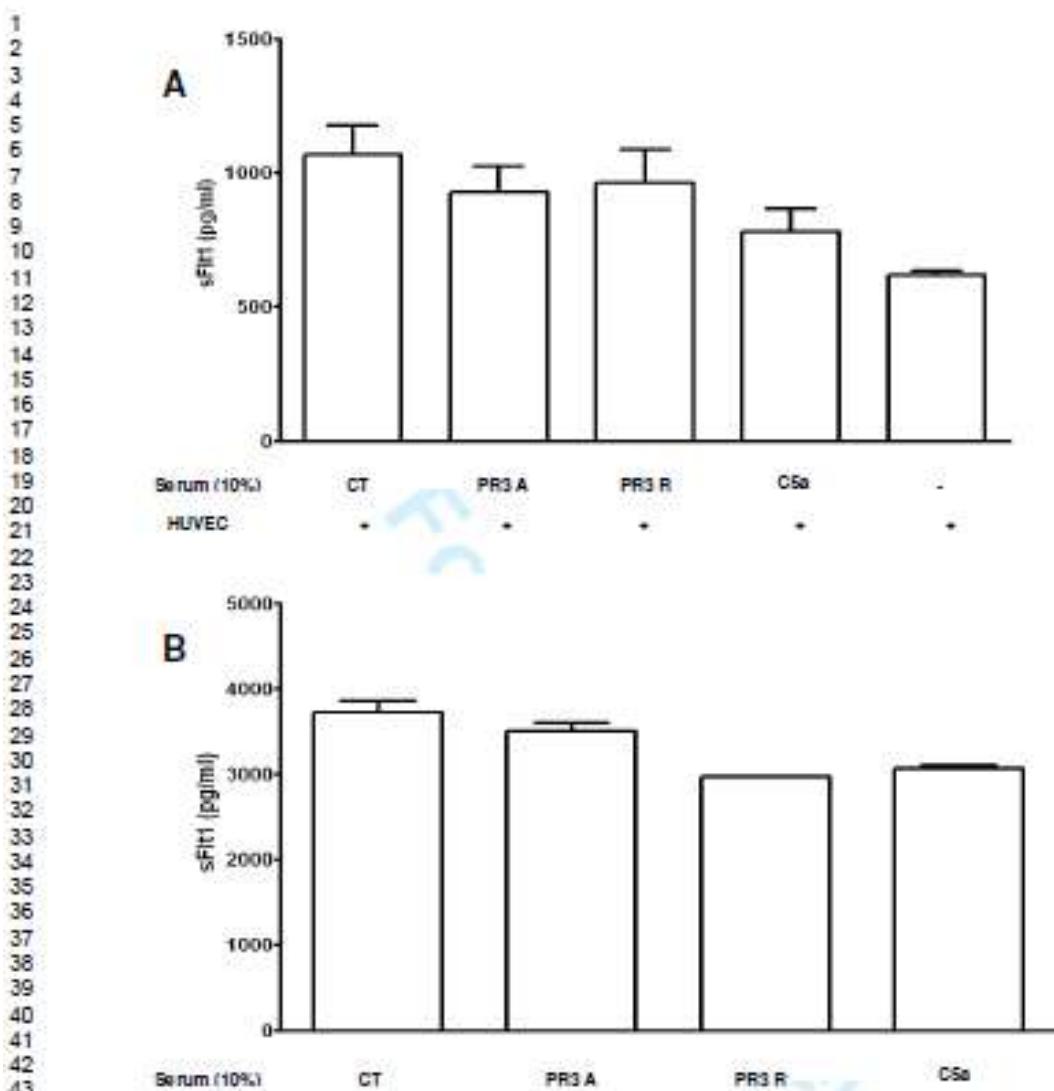


Figure 4: Serum (10%) from patients with acute (PR3A) or remission (PR3R) PR3-associated vasculitis phase did not induce an increase in sFlt1 secretion by HUVEC in vitro after 2h (A) or 16h (B)-incubation compared to controls (CT). Similar results were obtained using purified C5a or an anti-PR3 monoclonal antibody (not shown).

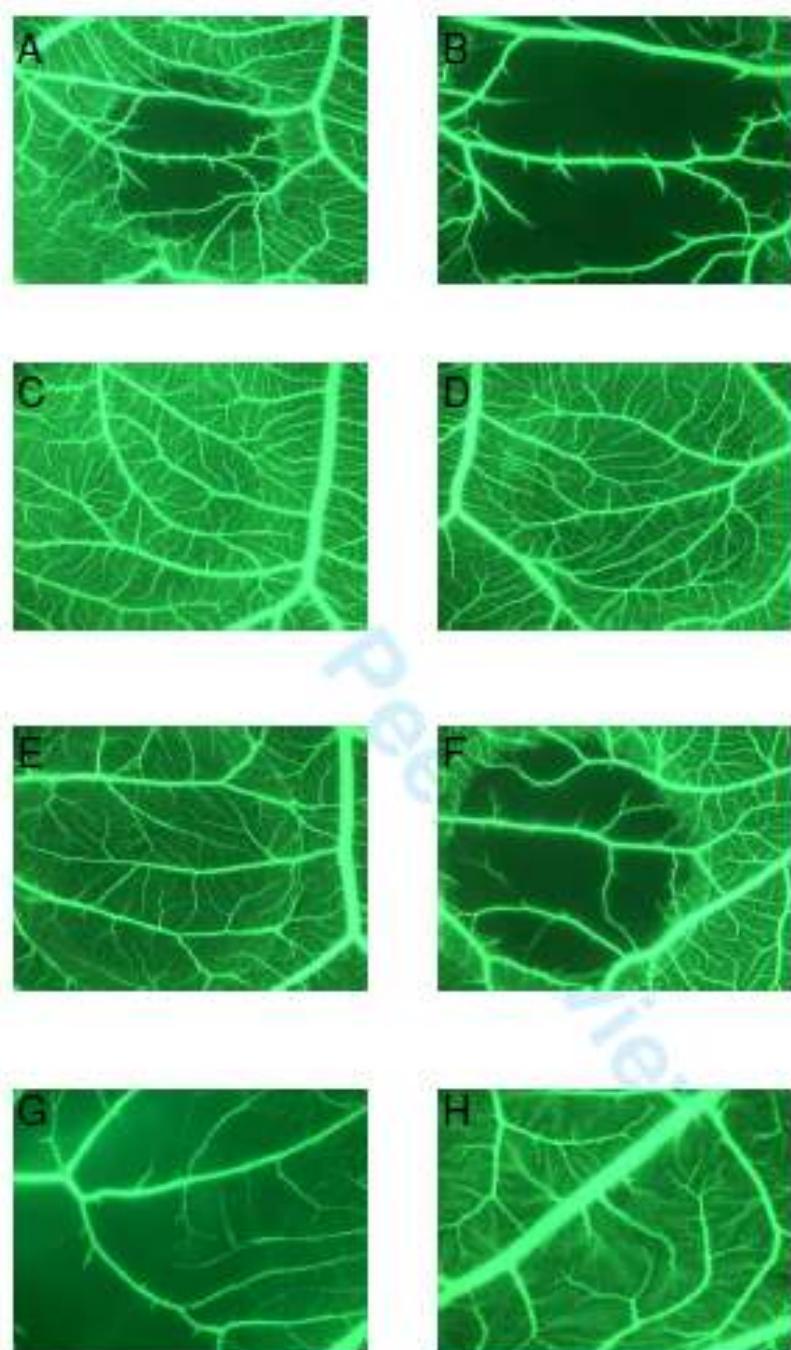


Figure 5: Representative pictures demonstrating the effect of serum from a patient with acute PR3-associated vasculitis (A, x1.25 and B, x4), PBS (C, x1.25), healthy control serum (D, x1.25), low-molecular fraction ( $K_d < 10$ ) (E, x1.25) or high-molecular weight fraction ( $K_d > 10$ ) (F, x1.25) of the serum from a patient with acute PR3-associated

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

vasculitis and serum from a patient with acute PR3-associated vasculitis without (G, x4) or with preincubation (H, x4) with human recombinant VEGF.

Serum from patients with acute PR3-associated induced a disruption of blood flow in the treated area. This effect was mediated by a molecule with a molecular weight > 10Kd and was completely blunted by human recombinant VEGF.

## **Bibliographie**

- Aalberse, Rob C, et Janine Schuurman. 2002. IgG4 breaking the rules. *Immunology* 105, n°. 1 (Janvier): 9-19.
- Afzali, B, R I Lechler, et M P Hernandez-Fuentes. 2007. Allorecognition and the alloresponse: clinical implications. *Tissue Antigens* 69, n°. 6 (Juin): 545-556. doi:10.1111/j.1399-0039.2007.00834.x.
- Anthony, Robert M, Falk Nimmerjahn, David J Ashline, Vernon N Reinhold, James C Paulson, et Jeffrey V Ravetch. 2008. Recapitulation of IVIG anti-inflammatory activity with a recombinant IgG Fc. *Science (New York, N.Y.)* 320, n°. 5874 (Avril 18): 373-376. doi:10.1126/science.1154315.
- Anthony, Robert M, Fredrik Wermeling, Mikael C I Karlsson, et Jeffrey V Ravetch. 2008. Identification of a receptor required for the anti-inflammatory activity of IVIG. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105, n°. 50 (Décembre 16): 19571-19578. doi:10.1073/pnas.0810163105.
- Antoine, C. 2008. [Transplantation strategies in immunized and hyperimmunized patients]. *Néphrologie & Thérapeutique* 4 Suppl 3 (Octobre): S174-178. doi:10.1016/S1769-7255(08)74230-5.
- Arndt, Robert, Sven Schmidt, Christoph Lodenkemper, Maria Grünbaum, Walter Zidek, Markus van der Giet, et Timm H Westhoff. 2010. Noninvasive evaluation of renal allograft fibrosis by transient elastography - a pilot study. *Transplant International: Official Journal of the European Society for Organ Transplantation* (Février 15). doi:10.1111/j.1432-2277.2010.01057.x. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20158692>.
- Arnold, M-L, M Dechant, I I N Doxiadis, et B M Spriewald. 2008a. Prevalence and specificity of immunoglobulin G and immunoglobulin A non-complement-binding anti-HLA alloantibodies in retransplant candidates. *Tissue Antigens* 72, n°. 1 (Juillet): 60-66. doi:10.1111/j.1399-0039.2008.01067.x.
- Ashton-Chess, Joanna, Magali Giral, Michael Mengel, Karine Renaudin, Yohann Foucher, Wilfried Gwinner, Christophe Braud, et al. 2008. Tribbles-1 as a novel biomarker of chronic antibody-mediated rejection. *Journal of the American Society of Nephrology: JASN* 19, n°. 6 (Juin): 1116-1127. doi:10.1681/ASN.2007101056.
- Aubert, Vincent, Jean-Pierre Venetz, Giuseppe Pantaleo, et Manuel Pascual. 2009. Low levels of human leukocyte antigen donor-specific antibodies detected by solid phase assay before transplantation are frequently clinically irrelevant. *Human Immunology* 70, n°. 8 (Août): 580-583. doi:10.1016/j.humimm.2009.04.011.
- Auger, I, N Balandraud, J Rak, N Lambert, M Martin, et J Roudier. 2009. New autoantigens in rheumatoid arthritis (RA): screening 8268 protein arrays with sera from patients with RA. *Annals of the Rheumatic Diseases* 68, n°. 4 (Avril): 591-594. doi:10.1136/ard.2008.096917.
- Babel, Ingrid, Rodrigo Barderas, Ramón Díaz-Uriarte, Jorge Luis Martínez-Torrecuadrada, Marta Sánchez-Carbayo, et J Ignacio Casal. 2009. Identification of tumor-associated autoantigens for the diagnosis of colorectal cancer in serum using high density protein microarrays. *Molecular & Cellular Proteomics: MCP* 8, n°. 10 (Octobre): 2382-2395. doi:10.1074/mcp.M800596-MCP200.
- Bach, F H, C Ferran, P Hechenleitner, W Mark, N Koyamada, T Miyatake, H Winkler, A Badrichani, D Candinas, et W W Hancock. 1997. Accommodation of vascularized xenografts: expression of "protective genes" by donor

- endothelial cells in a host Th2 cytokine environment. *Nature Medicine* 3, n°. 2 (Février): 196-204.
- Baldwin, W M, S K Pruitt, R B Brauer, M R Daha, et F Sanfilippo. 1995a. Complement in organ transplantation. Contributions to inflammation, injury, and rejection. *Transplantation* 59, n°. 6 (Mars 27): 797-808.
- Baldwin, William M, Edward K Kasper, Andrea A Zachary, Barbara A Wasowska, et E Rene Rodriguez. 2004. Beyond C4d: other complement-related diagnostic approaches to antibody-mediated rejection. *American Journal of Transplantation: Official Journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons* 4, n°. 3 (Mars): 311-318.
- Banasik, M, M Boratyńska, B Nowakowska, A Halon, K Kościelska-Kasprzak, D Drulis-Fajdusz, D Patrzałek, W Weyde, et M Klinger. 2007. Variability in donor-specific alloantibody production after transplantation. *Transplantation Proceedings* 39, n°. 9 (Novembre): 2715-2717. doi:10.1016/j.transproceed.2007.08.054.
- Bañón-Maneus, Elisenda, Fritz Diekmann, Montserrat Carrascal, Luis F Quintana, Daniel Moya-Rull, Monica Bescós, Maria J Ramírez-Bajo, et al. 2010. Two-dimensional difference gel electrophoresis urinary proteomic profile in the search of nonimmune chronic allograft dysfunction biomarkers. *Transplantation* 89, n°. 5 (Mars 15): 548-558. doi:10.1097/TP.0b013e3181c690e3.
- Barabanova, Yelena, Daniel S Ramon, et Anat R Tambur. 2009. Antibodies against HLA-DQ alpha-chain and their role in organ transplantation. *Human Immunology* 70, n°. 6 (Juin): 410-412. doi:10.1016/j.humimm.2009.02.002.
- Barocci, Sergio, Umberto Valente, et Arcangelo Nocera. 2007. Detection and analysis of HLA class I and class II specific alloantibodies in the sera of dialysis recipients waiting for a renal retransplantation. *Clinical Transplantation* 21, n°. 1 (Février): 47-56. doi:10.1111/j.1399-0012.2006.00578.x.
- Bartel, G, H Regele, M Wahrmann, N Huttary, M Exner, W H Hörl, et G A Böhmig. 2008. Posttransplant HLA alloreactivity in stable kidney transplant recipients-incidences and impact on long-term allograft outcomes. *American Journal of Transplantation: Official Journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons* 8, n°. 12 (Décembre): 2652-2660. doi:10.1111/j.1600-6143.2008.02428.x.
- Bartel, Gregor, Markus Wahrmann, Markus Exner, Heinz Regele, Martin Schillinger, Walter H Hörl, et Georg A Böhmig. 2007. Determinants of the complement-fixing ability of recipient presensitization against HLA antigens. *Transplantation* 83, n°. 6 (Mars 27): 727-733. doi:10.1097/TP.0000256337.18347.aa.
- Bekeredjian-Ding, Isabelle Béatrice, Isabelle Béatrice Berkerejian-Ding, Moritz Wagner, Veit Hornung, Thomas Giese, Max Schnurr, Stefan Endres, et Gunther Hartmann. 2005. Plasmacytoid dendritic cells control TLR7 sensitivity of naive B cells via type I IFN. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 174, n°. 7 (Avril 1): 4043-4050.
- Benain, Jean-Philippe, Bernadette Faller, Claude Briat, Christian Jacquelinet, Michèle Brami, Martine Aoustin, Jean-Pierre Dubois, Philippe Rieu, Cecile Behaghel, et Gérard Duru. 2007. [Cost of dialysis in France]. *Néphrologie & Thérapeutique* 3, n°. 3 (Juin): 96-106. doi:10.1016/j.nephro.2007.03.001.
- van den Berg, R H, M C Faber-Krol, R B Sim, et M R Daha. 1998. The first subcomponent of complement, C1q, triggers the production of IL-8, IL-6, and

- monocyte chemoattractant peptide-1 by human umbilical vein endothelial cells. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 161, n°. 12 (Décembre 15): 6924-6930.
- Bigler, Cornelia, Monica Schaller, Iryna Perahud, Michael Osthoff, et Marten Trendelenburg. 2009. Autoantibodies against complement C1q specifically target C1q bound on early apoptotic cells. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 183, n°. 5 (Septembre 1): 3512-3521. doi:10.4049/jimmunol.0803573.
- Bjorkman, P J, M A Saper, B Samraoui, W S Bennett, J L Strominger, et D C Wiley. 2005. Structure of the human class I histocompatibility antigen, HLA-A2. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 174, n°. 1 (Janvier 1): 6-19.
- Braud, V M, D S Allan, C A O'Callaghan, K Söderström, A D'Andrea, G S Ogg, S Lazetic, et al. 1998. HLA-E binds to natural killer cell receptors CD94/NKG2A, B and C. *Nature* 391, n°. 6669 (Février 19): 795-799. doi:10.1038/35869.
- Brown, J H, T S Jardetzky, J C Gorga, L J Stern, R G Urban, J L Strominger, et D C Wiley. 1993. Three-dimensional structure of the human class II histocompatibility antigen HLA-DR1. *Nature* 364, n°. 6432 (Juillet 1): 33-39. doi:10.1038/364033a0.
- Burkart, Gilbert J, Shashi Amur, Federico M Goodsaid, Lawrence J Lesko, Felix W Frueh, Shiew-Mei Huang, et Marc W Cavaille-Coll. 2008. Qualification of biomarkers for drug development in organ transplantation. *American Journal of Transplantation: Official Journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons* 8, n°. 2 (Février): 267-270. doi:10.1111/j.1600-6143.2007.02063.x.
- Burnier, Michel, et Anne Zanchi. 2006. Blockade of the renin-angiotensin-aldosterone system: a key therapeutic strategy to reduce renal and cardiovascular events in patients with diabetes. *Journal of Hypertension* 24, n°. 1 (Janvier): 11-25.
- Cai, Junchao, et Paul I Terasaki. 2008. Post-transplantation antibody monitoring and HLA antibody epitope identification. *Current Opinion in Immunology* 20, n°. 5 (Octobre): 602-606. doi:10.1016/j.coि.2008.07.008.
- Cai, Junchao, Paul I Terasaki, Naomi Anderson, Nils Lachmann, et Constanze Schönemann. 2009. Intact HLA not beta2m-free heavy chain-specific HLA class I antibodies are predictive of graft failure. *Transplantation* 88, n°. 2 (Juillet 27): 226-230. doi:10.1097/TP.0b013e3181ac6198.
- Campos, E F, H Tedesco-Silva, P G Machado, M Franco, J O Medina-Pestana, et M Gerbase-DeLima. 2006. Post-transplant anti-HLA class II antibodies as risk factor for late kidney allograft failure. *American Journal of Transplantation: Official Journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons* 6, n°. 10 (Octobre): 2316-2320. doi:10.1111/j.1600-6143.2006.01503.x.
- Carter, Paul J. 2006. Potent antibody therapeutics by design. *Nature Reviews. Immunology* 6, n°. 5 (Mai): 343-357. doi:10.1038/nri1837.
- Casciola-Rosen, L A, G Anhalt, et A Rosen. 1994. Autoantigens targeted in systemic lupus erythematosus are clustered in two populations of surface structures on apoptotic keratinocytes. *The Journal of Experimental Medicine* 179, n°. 4 (Avril 1): 1317-1330.
- Chalem, Ylana, Jean-Philippe Ryckelynck, Philippe Tuppin, Christian Verger, Sylvie Chauvé, et Denis Glotz. 2005. Access to, and outcome of, renal transplantation according to treatment modality of end-stage renal disease in France. *Kidney*

- International* 67, n°. 6 (Juin): 2448-2453. doi:10.1111/j.1523-1755.2005.00353.x.
- Choi, Bum Soon, Mi Jung Shin, Suk Joon Shin, Young Soo Kim, Yeong Jin Choi, Yong-Soo Kim, In Sung Moon, et al. 2005. Clinical significance of an early protocol biopsy in living-donor renal transplantation: ten-year experience at a single center. *American Journal of Transplantation: Official Journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons* 5, n°. 6 (Juin): 1354-1360. doi:10.1111/j.1600-6143.2005.00830.x.
- Colvin, Robert B. 2007. Antibody-mediated renal allograft rejection: diagnosis and pathogenesis. *Journal of the American Society of Nephrology: JASN* 18, n°. 4 (Avril): 1046-1056. doi:10.1681/ASN.2007010073.
- Cook, H Terence. 2010. The origin of renal fibroblasts and progression of kidney disease. *The American Journal of Pathology* 176, n°. 1 (Janvier): 22-24. doi:10.2353/ajpath.2010.090898.
- Cornaire, Emilie, Yi-Chun Dubois-Xu, Eric Rondeau, et Alexandre Hertig. 2010. [Interstitial fibrosis in renal grafts: On the way to a better detection.]. *Nephrologie & Thérapeutique* (Juin 1). doi:10.1016/j.nephro.2010.03.011. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20627838>.
- Cornell, Lynn D, R Neal Smith, et Robert B Colvin. 2008. Kidney transplantation: mechanisms of rejection and acceptance. *Annual Review of Pathology* 3: 189-220. doi:10.1146/annurev.pathmechdis.3.121806.151508.
- Cosio, F G, J M Gloor, S Sethi, et M D Stegall. 2008. Transplant glomerulopathy. *American Journal of Transplantation: Official Journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons* 8, n°. 3 (Mars): 492-496. doi:10.1111/j.1600-6143.2007.02104.x.
- Cravedi, Paolo, Umberto Maggiore, et Roslyn B Mannon. 2010. Low-density array PCR analysis of reperfusion biopsies: an adjunct to histological analysis. *Nephrology, Dialysis, Transplantation: Official Publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association* (Mai 26). doi:10.1093/ndt/gfq297. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20504838>.
- Cui, Z, H-Y Wang, et M-H Zhao. 2006. Natural autoantibodies against glomerular basement membrane exist in normal human sera. *Kidney International* 69, n°. 5 (Mars): 894-899. doi:10.1038/sj.ki.5000135.
- Cyster, J G, S B Hartley, et C C Goodnow. 1994. Competition for follicular niches excludes self-reactive cells from the recirculating B-cell repertoire. *Nature* 371, n°. 6496 (Septembre 29): 389-395. doi:10.1038/371389a0.
- Dengjel, Jörn, Oliver Schoor, Rainer Fischer, Michael Reich, Marianne Kraus, Margret Müller, Katharina Kreyemborg, et al. 2005. Autophagy promotes MHC class II presentation of peptides from intracellular source proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102, n°. 22 (Mai 31): 7922-7927. doi:10.1073/pnas.0501190102.
- Djamali, A, A Vidyasagar, M Adulla, D Hullett, et S Reese. 2009. Nox-2 is a modulator of fibrogenesis in kidney allografts. *American Journal of Transplantation: Official Journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons* 9, n°. 1 (Janvier): 74-82. doi:10.1111/j.1600-6143.2008.02463.x.
- Djamali, Arjang, et Millie Samaniego. 2009. Fibrogenesis in kidney transplantation: potential targets for prevention and therapy. *Transplantation* 88, n°. 10 (Novembre 27): 1149-1156. doi:10.1097/TP.0b013e3181bcccea.
- Dragun, Duska. 2008. Humoral responses directed against non-human leukocyte

- antigens in solid-organ transplantation. *Transplantation* 86, n°. 8 (Octobre 27): 1019-1025. doi:10.1097/TP.0b013e3181889748.
- Dragun, Duska, Dominik N Müller, Jan Hinrich Bräsen, Lutz Fritsche, Melina Nieminen-Kelhä, Ralf Dechend, Ulrich Kintscher, et al. 2005. Angiotensin II type 1-receptor activating antibodies in renal-allograft rejection. *The New England Journal of Medicine* 352, n°. 6 (Février 10): 558-569. doi:10.1056/NEJMoa035717.
- Duquesnoy, Rene J. 2008. Human leukocyte antigen class II antibodies and transplant outcome. *Transplantation* 86, n°. 5 (Septembre 15): 638-640. doi:10.1097/TP.0b013e318183749a.
- Duquesnoy, Rene J, Yehia Awadalla, Jon Lomago, Larry Jelinek, Judy Howe, Dwayne Zern, Betty Hunter, Joan Martell, Alin Girnita, et Adriana Zeevi. 2008. Retransplant candidates have donor-specific antibodies that react with structurally defined HLA-DR,DQ,DP epitopes. *Transplant Immunology* 18, n°. 4 (Février): 352-360. doi:10.1016/j.trim.2007.10.001.
- Einecke, G, B Sis, J Reeve, M Mengel, P M Campbell, L G Hidalgo, B Kaplan, et P F Halloran. 2009. Antibody-mediated microcirculation injury is the major cause of late kidney transplant failure. *American Journal of Transplantation: Official Journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons* 9, n°. 11 (Novembre): 2520-2531. doi:10.1111/j.1600-6143.2009.02799.x.
- El-Awar, N, J Lee, et P I Terasaki. 2005. HLA antibody identification with single antigen beads compared to conventional methods. *Human Immunology* 66, n°. 9 (Septembre): 989-997. doi:10.1016/j.humimm.2005.07.005.
- El-Zoghby, Z M, M D Stegall, D J Lager, W K Kremers, H Amer, J M Gloor, et F G Cosio. 2009. Identifying specific causes of kidney allograft loss. *American Journal of Transplantation: Official Journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons* 9, n°. 3 (Mars): 527-535. doi:10.1111/j.1600-6143.2008.02519.x.
- Eng, H S, G Bennett, E Tsipelas, M Lake, I Humphreys, S H Chang, P T H Coates, et G R Russ. 2008. Anti-HLA donor-specific antibodies detected in positive B-cell crossmatches by Luminex predict late graft loss. *American Journal of Transplantation: Official Journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons* 8, n°. 11 (Novembre): 2335-2342. doi:10.1111/j.1600-6143.2008.02387.x.
- Fedoseyeva, E V, F Zhang, P L Orr, D Levin, H J Buncke, et G Benichou. 1999. De novo autoimmunity to cardiac myosin after heart transplantation and its contribution to the rejection process. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 162, n°. 11 (Juin 1): 6836-6842.
- Fernández-Fresnedo, Gema, Jose Manuel Pastor, Marcos López-Hoyos, Juan Carlos Ruiz, Juan Antonio Zubimendi, Julio Gonzalez-Cotorruelo, Emilio Rodrigo, Angel L M De Francisco, et Manuel Arias. 2003. Relationship of donor-specific class-I anti-HLA antibodies detected by ELISA after kidney transplantation on the development of acute rejection and graft survival. *Nephrology, Dialysis, Transplantation: Official Publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association* 18, n°. 5 (Mai): 990-995.
- Feucht, Helmut E. 2003. Complement C4d in graft capillaries -- the missing link in the recognition of humoral alloreactivity. *American Journal of Transplantation: Official Journal of the American Society of Transplantation*

- and the American Society of Transplant Surgeons* 3, n°. 6 (Juin): 646-652.
- Fine, Leon G, et Jill T Norman. 2008. Chronic hypoxia as a mechanism of progression of chronic kidney diseases: from hypothesis to novel therapeutics. *Kidney International* 74, n°. 7 (Octobre): 867-872. doi:10.1038/ki.2008.350.
- Fukami, Naohiko, Sabarinathan Ramachandran, Deepti Saini, Michael Walter, William Chapman, G Alexander Patterson, et Thalachallour Mohanakumar. 2009. Antibodies to MHC class I induce autoimmunity: role in the pathogenesis of chronic rejection. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 182, n°. 1 (Janvier 1): 309-318.
- Galvani, S, N Augé, D Calise, J C Thiers, C Canivet, N Kamar, L Rostaing, et al. 2009. HLA class I antibodies provoke graft arteriosclerosis in human arteries transplanted into SCID/beige mice. *American Journal of Transplantation: Official Journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons* 9, n°. 11 (Novembre): 2607-2614. doi:10.1111/j.1600-6143.2009.02804.x.
- Gao, Ji, Leah-Ann Garulacan, Stephen M Storm, Gregory J Opitock, Yves Dubaqué, Stanley A Hefta, Donna M Dambach, et Ashok R Dongre. 2005. Biomarker discovery in biological fluids. *Methods (San Diego, Calif.)* 35, n°. 3 (Mars): 291-302. doi:10.1016/jymeth.2004.08.020.
- Gao, Zu-hua, Vivian C McAlister, James R Wright, Chloe C McAlister, Kevork Peltekian, et Allan S MacDonald. 2004. Immunoglobulin-G subclass antidonor reactivity in transplant recipients. *Liver Transplantation: Official Publication of the American Association for the Study of Liver Diseases and the International Liver Transplantation Society* 10, n°. 8 (Août): 1055-1059. doi:10.1002/lt.20154.
- Glaum, Mark C, Shilpi Narula, Decheng Song, Yi Zheng, Amy L Anderson, C Hank Pletcher, et Arnold I Levinson. 2009. Toll-like receptor 7-induced naive human B-cell differentiation and immunoglobulin production. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 123, n°. 1 (Janvier): 224-230.e4. doi:10.1016/j.jaci.2008.09.018.
- Goebel, Jens W D. 2009. Protein kinase Czeta: not-so-innocent bystander or unusual suspect in kidney transplant rejection? *Kidney International* 76, n°. 12 (Décembre): 1223-1224. doi:10.1038/ki.2009.393.
- Goodnow, C C, J Crosbie, S Adelstein, T B Lavoie, S J Smith-Gill, R A Brink, H Pritchard-Briscoe, J S Wotherspoon, R H Loblay, et K Raphael. 1988. Altered immunoglobulin expression and functional silencing of self-reactive B lymphocytes in transgenic mice. *Nature* 334, n°. 6184 (Août 25): 676-682. doi:10.1038/334676a0.
- Gornik, I, G Maravić, J Dumić, M Flögel, et G Lauc. 1999. Fucosylation of IgG heavy chains is increased in rheumatoid arthritis. *Clinical Biochemistry* 32, n°. 8 (Novembre): 605-608.
- Griffiths, Emmet J, Ruth E Nelson, Peter J Dupont, et Anthony N Warrens. 2004. Skewing of pretransplant anti-HLA class I antibodies of immunoglobulin G isotype solely toward immunoglobulin G1 subclass is associated with poorer renal allograft survival. *Transplantation* 77, n°. 11 (Juin 15): 1771-1773.
- Halloran, P, T Mathew, S Tomlanovich, C Groth, L Hootman, et C Barker. 1997. Mycophenolate mofetil in renal allograft recipients: a pooled efficacy analysis of three randomized, double-blind, clinical studies in prevention of rejection. The International Mycophenolate Mofetil Renal Transplant Study Groups. *Transplantation* 63, n°. 1 (Janvier 15): 39-47.

- van Ham, S M, E P Tjin, B F Lillemeier, U Grüneberg, K E van Meijgaarden, L Pastoors, D Verwoerd, et al. 1997. HLA-DO is a negative modulator of HLA-DM-mediated MHC class II peptide loading. *Current Biology: CB* 7, n°. 12 (Décembre 1): 950-957.
- Han, S, B Zheng, D G Schatz, E Spanopoulou, et G Kelsoe. 1996. Neoteny in lymphocytes: Rag1 and Rag2 expression in germinal center B cells. *Science (New York, N.Y.)* 274, n°. 5295 (Décembre 20): 2094-2097.
- Hancock, W W, R Buelow, M H Sayegh, et L A Turka. 1998. Antibody-induced transplant arteriosclerosis is prevented by graft expression of anti-oxidant and anti-apoptotic genes. *Nature Medicine* 4, n°. 12 (Décembre): 1392-1396. doi:10.1038/3982.
- de Heer, E, A Davidoff, A van der Wal, M van Geest, et L C Paul. 1994. Chronic renal allograft rejection in the rat. Transplantation-induced antibodies against basement membrane antigens. *Laboratory Investigation; a Journal of Technical Methods and Pathology* 70, n°. 4 (Avril): 494-502.
- Heinemann, Falko M, Ioana Roth, Vera Rebmann, Marie-Luise Arnold, Oliver Witzke, Benjamin Wilde, Bernd M Spriewald, et Hans Grosse-Wilde. 2007. Immunoglobulin isotype-specific characterization of anti-human leukocyte antigen antibodies eluted from explanted renal allografts. *Human Immunology* 68, n°. 6 (Juin): 500-506. doi:10.1016/j.humimm.2007.02.007.
- Higgins, Rob, Mark Hathaway, David Lowe, For Lam, Habib Kashi, Lam Chin Tan, Chris Imray, et al. 2007. Blood levels of donor-specific human leukocyte antigen antibodies after renal transplantation: resolution of rejection in the presence of circulating donor-specific antibody. *Transplantation* 84, n°. 7 (Octobre 15): 876-884. doi:10.1097/01.tp.0000284729.39137.6e.
- Hoffmann, Steven C, Douglas A Hale, David E Kleiner, Roslyn B Mannon, Robert L Kampen, Lynn M Jacobson, Linda C Cendales, S John Swanson, Bryan N Becker, et Allan D Kirk. 2005a. Functionally significant renal allograft rejection is defined by transcriptional criteria. *American Journal of Transplantation: Official Journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons* 5, n°. 3 (Mars): 573-581. doi:10.1111/j.1600-6143.2005.00719.x.
- Horn, Sabine, Angelika Lueking, Derek Murphy, Alexander Staudt, Claudia Gutjahr, Kirsten Schulte, Andrea König, et al. 2006. Profiling humoral autoimmune repertoire of dilated cardiomyopathy (DCM) patients and development of a disease-associated protein chip. *Proteomics* 6, n°. 2 (Janvier): 605-613. doi:10.1002/pmic.200401293.
- Hourmant, Maryvonne, Anne Cesbron-Gautier, Paul I Terasaki, Kazuo Mizutani, Anne Moreau, Aurélie Meurette, Jacques Dantal, et al. 2005. Frequency and clinical implications of development of donor-specific and non-donor-specific HLA antibodies after kidney transplantation. *Journal of the American Society of Nephrology: JASN* 16, n°. 9 (Septembre): 2804-2812. doi:10.1681/ASN.2004121130.
- Howell, W M, V Carter, et B Clark. 2010. The HLA system: immunobiology, HLA typing, antibody screening and crossmatching techniques. *Journal of Clinical Pathology* 63, n°. 5 (Mai): 387-390. doi:10.1136/jcp.2009.072371.
- Hudson, Michael E, Irina Pozdnyakova, Kenneth Haines, Gil Mor, et Michael Snyder. 2007. Identification of differentially expressed proteins in ovarian cancer using high-density protein microarrays. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104, n°. 44 (Octobre 30): 17494-

17499. doi:10.1073/pnas.0708572104.
- Issa, Naim, Fernando G Cosio, James M Gloor, Sanjeev Sethi, Patrick G Dean, S Breanndan Moore, Steve DeGoey, et Mark D Stegall. 2008. Transplant glomerulopathy: risk and prognosis related to anti-human leukocyte antigen class II antibody levels. *Transplantation* 86, n°. 5 (Septembre 15): 681-685. doi:10.1097/TP.0b013e3181837626.
- Janeway, Charles, A, Paul Travers, Mark Walport, et Mark, J Shlomchik. 2003. Le système du complément et l'immunité innée. Dans *Immunobiologie: Le système immunitaire fondamental et pathologique*, 43-64.
- Jean-Denis Bignon. 2000. Système HLA. Dans *Encyclopédie Médico-Chirurgicale - Hématologie*, 16. Editions Scientifiques et Médicales Elsevier SAS. Paris.
- Jensen, P E. 1998. Antigen processing: HLA-DO--a hitchhiking inhibitor of HLA-DM. *Current Biology: CB* 8, n°. 4 (Février 12): R128-131.
- Joosten, Simone A, Mieneke G A van Dixhoorn, Maria C Borrias, Hallgrímur Benediktsson, Peter A van Veelen, Cees van Kooten, et Leendert C Paul. 2002a. Antibody response against perlecan and collagen types IV and VI in chronic renal allograft rejection in the rat. *The American Journal of Pathology* 160, n°. 4 (Avril): 1301-1310.
- Joosten, Simone A, Yvo W J Sijpkens, Vanessa van Ham, Leendert A Trouw, Johan van der Vlag, Bert van den Heuvel, Cees van Kooten, et Leendert C Paul. 2005a. Antibody response against the glomerular basement membrane protein agrin in patients with transplant glomerulopathy. *American Journal of Transplantation: Official Journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons* 5, n°. 2 (Février): 383-393. doi:10.1111/j.1600-6143.2005.00690.x.
- Jurcevic, S, M E Ainsworth, A Pomerance, J D Smith, D R Robinson, M J Dunn, M H Yacoub, et M L Rose. 2001. Antivimentin antibodies are an independent predictor of transplant-associated coronary artery disease after cardiac transplantation. *Transplantation* 71, n°. 7 (Avril 15): 886-892.
- Kahan, B D, P R Rajagopalan, et M Hall. 1999. Reduction of the occurrence of acute cellular rejection among renal allograft recipients treated with basiliximab, a chimeric anti-interleukin-2-receptor monoclonal antibody. United States Simulect Renal Study Group. *Transplantation* 67, n°. 2 (Janvier 27): 276-284.
- Kaneko, Yoshikatsu, Falk Nimmerjahn, et Jeffrey V Ravetch. 2006. Anti-inflammatory activity of immunoglobulin G resulting from Fc sialylation. *Science (New York, N.Y.)* 313, n°. 5787 (Août 4): 670-673. doi:10.1126/science.1129594.
- Kawai, Taro, et Shizuo Akira. 2008. Toll-like receptor and RIG-I-like receptor signaling. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1143 (Novembre): 1-20. doi:10.1196/annals.1443.020.
- Kim, Jinu, Young Mi Seok, Kyong-Jin Jung, et Kwon Moo Park. 2009. Reactive oxygen species/oxidative stress contributes to progression of kidney fibrosis following transient ischemic injury in mice. *American Journal of Physiology. Renal Physiology* 297, n°. 2 (Août): F461-470. doi:10.1152/ajprenal.90735.2008.
- Klitz, W, M Maiers, S Spellman, L A Baxter-Lowe, B Schmeckpeper, T M Williams, et M Fernandez-Viña. 2003. New HLA haplotype frequency reference standards: high-resolution and large sample typing of HLA DR-DQ haplotypes in a sample of European Americans. *Tissue Antigens* 62, n°. 4 (Octobre): 296-307.

- Koch, Manuel, Guido Veit, Sigmar Stricker, Pinaki Bhatt, Stefanie Kutsch, Peihong Zhou, Elina Reinders, et al. 2006. Expression of type XXIII collagen mRNA and protein. *The Journal of Biological Chemistry* 281, n°. 30 (Juillet 28): 21546-21557. doi:10.1074/jbc.M604131200.
- Kosmoliaptis, Vasilis, J Andrew Bradley, Sarah Peacock, Afzal N Chaudhry, et Craig J Taylor. 2009. Detection of immunoglobulin G human leukocyte antigen-specific alloantibodies in renal transplant patients using single-antigen-beads is compromised by the presence of immunoglobulin M human leukocyte antigen-specific alloantibodies. *Transplantation* 87, n°. 6 (Mars 27): 813-820. doi:10.1097/TP.0b013e318199c581.
- Kushihata, Fumiki, Jota Watanabe, Arend Mulder, Frans Claas, et Juan C Scornik. 2004a. Human leukocyte antigen antibodies and human complement activation: role of IgG subclass, specificity, and cytotoxic potential. *Transplantation* 78, n°. 7 (Octobre 15): 995-1001.
- Lalive, P H, T Menge, I Barman, B A Cree, et C P Genain. 2006. Identification of new serum autoantibodies in neuromyelitis optica using protein microarrays. *Neurology* 67, n°. 1 (Juillet 11): 176-177. doi:10.1212/01.wnl.0000223346.09426.34.
- Land, Walter G. 2005. The role of postischemic reperfusion injury and other nonantigen-dependent inflammatory pathways in transplantation. *Transplantation* 79, n°. 5 (Mars 15): 505-514.
- Lawson, Charlotte, Angela L Holder, Rachel E Stanford, John Smith, et Marlene L Rose. 2005. Anti-intercellular adhesion molecule-1 antibodies in sera of heart transplant recipients: a role in endothelial cell activation. *Transplantation* 80, n°. 2 (Juillet 27): 264-271.
- Le Bas-Bernardet, Stéphanie, Maryvonne Hourmant, Stéphanie Coupel, Jean-Denis Bignon, Jean-Paul Soulillou, et Béatrice Charreau. 2003. Non-HLA-type endothelial cell reactive alloantibodies in pre-transplant sera of kidney recipients trigger apoptosis. *American Journal of Transplantation: Official Journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons* 3, n°. 2 (Février): 167-177.
- Le Bas-Bernardet, Stéphanie, Maryvonne Hourmant, Nathalie Valentin, Catherine Paitier, Magali Giral-Classe, Sylvie Curry, Gilles Follea, Jean-Paul Soulillou, et Jean-Denis Bignon. 2003. Identification of the antibodies involved in B-cell crossmatch positivity in renal transplantation. *Transplantation* 75, n°. 4 (Février 27): 477-482. doi:10.1097/01.TP.0000047311.77702.59.
- Lefaucheur, C, C Suberbielle-Boissel, G S Hill, D Nochy, J Andrade, C Antoine, C Gautreau, D Charron, et D Glotz. 2009. Clinical relevance of preformed HLA donor-specific antibodies in kidney transplantation. *Contributions to Nephrology* 162: 1-12. doi:10.1159/000170788.
- Lefaucheur, Carmen, Alexandre Loupy, Gary S Hill, Joao Andrade, Dominique Nochy, Corinne Antoine, Chantal Gautreau, Dominique Charron, Denis Glotz, et Caroline Suberbielle-Boissel. 2010. Preexisting donor-specific HLA antibodies predict outcome in kidney transplantation. *Journal of the American Society of Nephrology: JASN* 21, n°. 8 (Août): 1398-1406. doi:10.1681/ASN.2009101065.
- Legendre, C, E Thervet, H Skhiri, M F Mamzer-Bruneel, F Cantarovich, L H Noël, et H Kreis. 1998. Histologic features of chronic allograft nephropathy revealed by protocol biopsies in kidney transplant recipients. *Transplantation* 65, n°. 11 (Juin 15): 1506-1509.

- Lemy, Anne, Marc Andrien, Karl M Wissing, Khadija Ryhahi, Aurélie Vandersarren, Judith Racapé, Christine Heylen, et al. 2010. Major Histocompatibility Complex Class 1 Chain-Related Antigen A Antibodies: Sensitizing Events and Impact on Renal Graft Outcomes. *Transplantation* (Mai 11). doi:10.1097/TP.0b013e3181e228f7.  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20463636>.
- Lerut, Evelyne, Maarten Naesens, Dirk R Kuypers, Yves Vanrenterghem, et Boudewijn Van Damme. 2007. Subclinical peritubular capillaritis at 3 months is associated with chronic rejection at 1 year. *Transplantation* 83, n°. 11 (Juin 15): 1416-1422. doi:10.1097/01.tp.0000266676.10550.70.
- Li, Li, Persis Wadia, Rong Chen, Neeraja Kambham, Maarten Naesens, Tara K Sigdel, David B Miklos, Minnie M Sarwal, et Atul J Butte. 2009. Identifying compartment-specific non-HLA targets after renal transplantation by integrating transcriptome and "antibodyome" measures. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106, n°. 11 (Mars 17): 4148-4153. doi:10.1073/pnas.0900563106.
- Li, Quan-Zhen, Quan Li Zhen, Chun Xie, Tianfu Wu, Meggan Mackay, Cynthia Aranow, Chaim Puterman, et Chandra Mohan. 2005. Identification of autoantibody clusters that best predict lupus disease activity using glomerular proteome arrays. *The Journal of Clinical Investigation* 115, n°. 12 (Décembre): 3428-3439. doi:10.1172/JCI23587.
- Lobashevsky, A, K Rosner, W Goggins, et N Higgins. 2010. Subtypes of immunoglobulin (Ig)-G antibodies against donor class II HLA and cross-match results in three kidney transplant candidates. *Transplant Immunology* 23, n°. 1 (Mai): 81-85. doi:10.1016/j.trim.2010.03.003.
- Loupy, A, G S Hill, D Nochy, et C Legendre. 2010. Antibody-mediated microcirculation injury is the major cause of late kidney transplant failure. *American Journal of Transplantation: Official Journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons* 10, n°. 4 (Avril): 952; author reply 953. doi:10.1111/j.1600-6143.2009.02974.x.
- Loupy, A, C Suberbielle-Boissel, G S Hill, C Lefaucheur, D Anglicheau, J Zuber, F Martinez, et al. 2009. Outcome of subclinical antibody-mediated rejection in kidney transplant recipients with preformed donor-specific antibodies. *American Journal of Transplantation: Official Journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons* 9, n°. 11 (Novembre): 2561-2570. doi:10.1111/j.1600-6143.2009.02813.x.
- Loupy, Alexandre, Caroline Suberbielle-Boissel, Julien Zuber, Dany Anglicheau, Marc-Olivier Timsit, Frank Martinez, Eric Thervet, et al. 2010. Combined posttransplant prophylactic IVIg/anti-CD 20/plasmapheresis in kidney recipients with preformed donor-specific antibodies: a pilot study. *Transplantation* 89, n°. 11 (Juin 15): 1403-1410. doi:10.1097/TP.0b013e3181da1cc3.
- Mannon, R B, et R Fairchild. 2010. Allograft fibrosis--unmasking the players at the dance. *American Journal of Transplantation: Official Journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons* 10, n°. 2 (Février): 201-202.
- Mao, Quanzong, Paul I Terasaki, Junchao Cai, Nadim El-Awar, et Lorita Rebellato. 2007. Analysis of HLA class I specific antibodies in patients with failed allografts. *Transplantation* 83, n°. 1 (Janvier 15): 54-61.

- doi:10.1097/01.tp.0000250492.55775.83.
- Marrari, Marilyn, et Rene J Duquesnoy. 2010. Detection of donor-specific HLA antibodies before and after removal of a rejected kidney transplant. *Transplant Immunology* 22, n°. 3 (Février): 105-109. doi:10.1016/j.trim.2009.12.005.
- Mauiyyedi, S, P D Pelle, S Saidman, A B Collins, M Pascual, N E Tolkoff-Rubin, W W Williams, A A Cosimi, E E Schnieberger, et R B Colvin. 2001. Chronic humoral rejection: identification of antibody-mediated chronic renal allograft rejection by C4d deposits in peritubular capillaries. *Journal of the American Society of Nephrology: JASN* 12, n°. 3 (Mars): 574-582.
- Mayer, A D, J Dmitrewski, J P Squifflet, T Besse, B Grabensee, B Klein, F W Eigler, et al. 1997. Multicenter randomized trial comparing tacrolimus (FK506) and cyclosporine in the prevention of renal allograft rejection: a report of the European Tacrolimus Multicenter Renal Study Group. *Transplantation* 64, n°. 3 (Août 15): 436-443.
- Mengel, M, W Gwinner, A Schwarz, R Bajeski, I Franz, V Bröcker, T Becker, et al. 2007. Infiltrates in protocol biopsies from renal allografts. *American Journal of Transplantation: Official Journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons* 7, n°. 2 (Février): 356-365.
- Minami, K, K Murata, C-Y Lee, K Fox-Talbot, B A Wasowska, M D Pescovitz, et W M Baldwin. 2006. C4d deposition and clearance in cardiac transplants correlates with alloantibody levels and rejection in rats. *American Journal of Transplantation: Official Journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons* 6, n°. 5 (Mai): 923-932. doi:10.1111/j.1600-6143.2006.01281.x.
- Mohanakumar, T, T M Ellis, H Dayal, C DuVall, G Mendez-Picon, et H M Lee. 1981. Potentiating effect of HLA matching and blood transfusion on renal allograft survival. *Transplantation* 32, n°. 3 (Septembre): 244-247.
- Morales-Buenrostro, Luis E, Paul I Terasaki, Lluvia A Marino-Vázquez, Jar-How Lee, Nadim El-Awar, et Josefina Alberú. 2008. "Natural" human leukocyte antigen antibodies found in nonalloimmunized healthy males. *Transplantation* 86, n°. 8 (Octobre 27): 1111-1115. doi:10.1097/TP.0b013e318186d87b.
- Moreau, P, E Carosella, M Teyssier, S Prost, E Gluckman, J Dausset, et M Kirszenbaum. 1995. Soluble HLA-G molecule. An alternatively spliced HLA-G mRNA form candidate to encode it in peripheral blood mononuclear cells and human trophoblasts. *Human Immunology* 43, n°. 3 (Juillet): 231-236.
- Morgan, B, Paul. 1998. The Human Complement System in Health and Disease. *Annals of the Rheumatic Diseases* 57, n°. 10 (Octobre 1): 581. doi:10.1136/ard.57.10.581.
- Morris, P J, M R Mickey, D P Singal, et P I Terasaki. 1969. Serotyping for homotransplantation. XXII. Specificity of cytotoxic antibodies developing after renal transplantation. *British Medical Journal* 1, n°. 5646 (Mars 22): 758-759.
- Nam, Myeong J, Juan Madoz-Gurpide, Hong Wang, Pascal Lescure, Cecelia E Schmalbach, Rong Zhao, David E Misek, Rork Kuick, Dean E Brenner, et Samir M Hanash. 2003. Molecular profiling of the immune response in colon cancer using protein microarrays: occurrence of autoantibodies to ubiquitin C-terminal hydrolase L3. *Proteomics* 3, n°. 11 (Novembre): 2108-2115. doi:10.1002/pmic.200300594.
- Nankivell, B J, et J R Chapman. 2006. The significance of subclinical rejection and

- the value of protocol biopsies. *American Journal of Transplantation: Official Journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons* 6, n°. 9 (Septembre): 2006-2012. doi:10.1111/j.1600-6143.2006.01436.x.
- Nankivell, Brian J, Richard J Borrows, Caroline L-S Fung, Philip J O'Connell, Richard D M Allen, et Jeremy R Chapman. 2003. The natural history of chronic allograft nephropathy. *The New England Journal of Medicine* 349, n°. 24 (Décembre 11): 2326-2333. doi:10.1056/NEJMoa020009.
- Nankivell BJ, Borrows RJ, Fung CL, O'Connell PJ, Allen RD, Chapman JR. 2004. Natural history, risk factors, and impact of subclinical rejection in kidney transplantation. *Transplantation* 78, n°. 2 (Juillet 27): 242-249.
- Nath, DS, H Ilias Basha, et T Mohanakumar. 2010. Anti-Human Leukocyte Antigen Antibody Induced Autoimmunity: Role In Chronic Rejection. *Current opinion in organ transplantation* 15, n°. 1 (Février): 16-20. doi:10.1097/MOT.0b013e3283342780.
- Nayak, Annapurna, Janez Ferluga, Anthony G Tsolaki, et Uday Kishore. 2010. The non-classical functions of the classical complement pathway recognition subcomponent C1q. *Immunology Letters* 131, n°. 2 (Juillet 8): 139-150. doi:10.1016/j.imlet.2010.03.012.
- Nemazee, D A, et K Bürki. 1989. Clonal deletion of B lymphocytes in a transgenic mouse bearing anti-MHC class I antibody genes. *Nature* 337, n°. 6207 (Février 9): 562-566. doi:10.1038/337562a0.
- Nemazee, David. 1999. Receptor Editing in B Cells. Dans , Volume 74:89-126. Academic Press. <http://www.sciencedirect.com/science/article/B7CT8-4SGTHP7-6/2/014db58b03123a233c179fd449894506>.
- Nickeleit, V, et K Andreoni. 2007. The classification and treatment of antibody-mediated renal allograft injury: where do we stand? *Kidney International* 71, n°. 1 (Janvier): 7-11. doi:10.1038/sj.ki.5002003.
- Opelz, G, T Wujciak, B Döhler, S Scherer, et J Mytilineos. 1999. HLA compatibility and organ transplant survival. Collaborative Transplant Study. *Reviews in Immunogenetics* 1, n°. 3: 334-342.
- O'Riordan, E, T N Orlova, V N Podust, P N Chander, S Yanagi, M Nakazato, R Hu, K Butt, V Delaney, et M S Goligorsky. 2007. Characterization of urinary peptide biomarkers of acute rejection in renal allografts. *American Journal of Transplantation: Official Journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons* 7, n°. 4 (Avril): 930-940. doi:10.1111/j.1600-6143.2007.01733.x.
- Palomar, R, M López-Hoyos, J M Pastor, G Fernández-Fresnedo, E Rodrigo, J C Ruiz, J G Cotorruelo, et al. 2005. Impact of HLA antibodies on transplant glomerulopathy. *Transplantation Proceedings* 37, n°. 9 (Novembre): 3830-3832. doi:10.1016/j.transproceed.2005.10.077.
- Papp, Krisztián, Péter Végh, Kata Miklós, Julianna Németh, Klára Ráska, Ferenc Péterfy, Anna Erdei, et József Prechl. 2008. Detection of complement activation on antigen microarrays generates functional antibody profiles and helps characterization of disease-associated changes of the antibody repertoire. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 181, n°. 11 (Décembre 1): 8162-8169.
- Piazza, Antonina, Elvira Poggi, Giuseppina Ozzella, Laura Borrelli, Palmina I Monaco, Alessandra Scornajenghi, Giuseppe Tisone, et Domenico Adorno. 2006. Public epitope specificity of HLA class I antibodies induced by a failed

- kidney transplant: alloantibody characterization by flow cytometric techniques. *Transplantation* 81, n°. 9 (Mai 15): 1298-1305. doi:10.1097/01.tp.0000209654.87584.c5.
- Ponticelli, Claudio. 2010. Humoral antibodies in organ transplantation: angels or demons? *American Journal of Transplantation: Official Journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons* 10, n°. 5 (Mai): 1332; author reply 1333. doi:10.1111/j.1600-6143.2009.02990.x.
- Porcheray, Fabrice, Julie DeVito, Beow Y Yeap, Lijuan Xue, Ian Dargon, Rosemary Paine, Timothy C Girouard, et al. 2010. Chronic humoral rejection of human kidney allografts associates with broad autoantibody responses. *Transplantation* 89, n°. 10 (Mai 27): 1239-1246. doi:10.1097/TP.0b013e3181d72091.
- Quintana, Luis F, Elisenda Bañon-Maneus, Amanda Solé-Gonzalez, et Josep M Campistol. 2009. Urine proteomics biomarkers in renal transplantation: an overview. *Transplantation* 88, n°. 3 (Août 15): S45-49. doi:10.1097/TP.0b013e3181af7cba.
- Quintana, Luís F, Amanda Solé-Gonzalez, Susana G Kalko, Elisenda Bañon-Maneus, Manel Solé, Fritz Diekmann, Alex Gutierrez-Dalmau, Joaquin Abian, et Josep M Campistol. 2009. Urine proteomics to detect biomarkers for chronic allograft dysfunction. *Journal of the American Society of Nephrology: JASN* 20, n°. 2 (Février): 428-435. doi:10.1681/ASN.2007101137.
- Racusen, L C, K Solez, R B Colvin, S M Bonsib, M C Castro, T Cavallo, B P Croker, et al. 1999. The Banff 97 working classification of renal allograft pathology. *Kidney International* 55, n°. 2 (Février): 713-723. doi:10.1046/j.1523-1755.1999.00299.x.
- Racusen, Lorraine C, Robert B Colvin, Kim Solez, Michael J Mihatsch, Philip F Halloran, Patricia M Campbell, Michael J Cecka, et al. 2003. Antibody-mediated rejection criteria - an addition to the Banff 97 classification of renal allograft rejection. *American Journal of Transplantation: Official Journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons* 3, n°. 6 (Juin): 708-714.
- Regele, Heinz, Georg A Böhmig, Antje Habicht, Daniela Gollowitzer, Martin Schillinger, Susanne Rockenschaub, Bruno Watschinger, Dortscho Kerjaschki, et Markus Exner. 2002. Capillary deposition of complement split product C4d in renal allografts is associated with basement membrane injury in peritubular and glomerular capillaries: a contribution of humoral immunity to chronic allograft rejection. *Journal of the American Society of Nephrology: JASN* 13, n°. 9 (Septembre): 2371-2380.
- Rondeau, Eric, Alexandre Hertig, Cédric Rafat, et Yi-chun Xu-Dubois. 2009. [Epithelial-mesenchymal transition in kidney grafts]. *Bulletin De l'Académie Nationale De Médecine* 193, n°. 9 (Décembre): 2005-2014; discussion 2014-2015.
- Rose, M L. 2004. Role of MHC and non-MHC alloantibodies in graft rejection. *Current Opinion in Organ Transplantation*.
- Rose, Marlene L, et John D Smith. 2009. Clinical relevance of complement-fixing antibodies in cardiac transplantation. *Human Immunology* 70, n°. 8 (Août): 605-609. doi:10.1016/j.humimm.2009.04.016.
- Rother, R P, J Arp, J Jiang, W Ge, S J Faas, W Liu, D R Gies, A M Jevnikar, B Garcia, et H Wang. 2008. C5 blockade with conventional immunosuppression

- induces long-term graft survival in presensitized recipients. *American Journal of Transplantation: Official Journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons* 8, n°. 6 (Juin): 1129-1142. doi:10.1111/j.1600-6143.2008.02222.x.
- Rush, David. 2010. Protocol biopsies for renal transplantation. *Saudi Journal of Kidney Diseases and Transplantation: An Official Publication of the Saudi Center for Organ Transplantation, Saudi Arabia* 21, n°. 1 (Janvier): 1-9.
- Russell, D M, Z Dembić, G Morahan, J F Miller, K Bürki, et D Nemazee. 1991. Peripheral deletion of self-reactive B cells. *Nature* 354, n°. 6351 (Novembre 28): 308-311. doi:10.1038/354308a0.
- Salfeld, Jochen G. 2007a. Isotype selection in antibody engineering. *Nature Biotechnology* 25, n°. 12 (Décembre): 1369-1372. doi:10.1038/nbt1207-1369.
- Savoye, Emilie, Dorothée Tamarelle, Ylana Chalem, Jean-Michel Rebibou, et Philippe Tuppin. 2007. Survival benefits of kidney transplantation with expanded criteria deceased donors in patients aged 60 years and over. *Transplantation* 84, n°. 12 (Décembre 27): 1618-1624. doi:10.1097/01.tp.0000295988.28127.dd.
- Scallon, Bernard, Stephen McCarthy, Jennifer Radewonuk, Ann Cai, Michael Naso, T Shantha Raju, et Renold Capocasale. 2007. Quantitative in vivo comparisons of the Fc gamma receptor-dependent agonist activities of different fucosylation variants of an immunoglobulin G antibody. *International Immunopharmacology* 7, n°. 6 (Juin): 761-772. doi:10.1016/j.intimp.2007.01.014.
- Schlondorff, Detlef O. 2008. Overview of factors contributing to the pathophysiology of progressive renal disease. *Kidney International* 74, n°. 7 (Octobre): 860-866. doi:10.1038/ki.2008.351.
- Schmeding, M, A Dankof, V Krenn, M G Krukemeyer, M Koch, A Spinelli, J M Langrehr, U P Neumann, et P Neuhaus. 2006. C4d in acute rejection after liver transplantation--a valuable tool in differential diagnosis to hepatitis C recurrence. *American Journal of Transplantation: Official Journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons* 6, n°. 3 (Mars): 523-530. doi:10.1111/j.1600-6143.2005.01180.x.
- Schönemann, C, J Groth, S Leverenz, et G May. 1998. HLA class I and class II antibodies: monitoring before and after kidney transplantation and their clinical relevance. *Transplantation* 65, n°. 11 (Juin 15): 1519-1523.
- Schwarz, Anke, Michael Mengel, Wilfried Gwinner, Joerg Radermacher, Marcus Hiss, Hans Kreipe, et Hermann Haller. 2005. Risk factors for chronic allograft nephropathy after renal transplantation: a protocol biopsy study. *Kidney International* 67, n°. 1 (Janvier): 341-348. doi:10.1111/j.1523-1755.2005.00087.x.
- Scornik, J C, G Guerra, J D Schold, T R Srinivas, D Dragun, et H-U Meier-Kriesche. 2007. Value of posttransplant antibody tests in the evaluation of patients with renal graft dysfunction. *American Journal of Transplantation: Official Journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons* 7, n°. 7 (Juillet): 1808-1814. doi:10.1111/j.1600-6143.2007.01855.x.
- Seemayer, Christian A, Ariana Gaspert, Volker Nickeleit, et Michael J Mihatsch. 2007. C4d staining of renal allograft biopsies: a comparative analysis of different staining techniques. *Nephrology, Dialysis, Transplantation: Official Publication of the European Dialysis and Transplant Association - European*

- Renal Association* 22, n°. 2 (Février): 568-576. doi:10.1093/ndt/gfl594.
- Servais, Aude, Vannary Meas-Yedid, Emmanuel Morelon, Mathias Strupler, Marie-Claire Schanne-Klein, Christophe Legendre, Jean-Christophe Olivo-Marin, et Eric Thervet. 2009. Apports récents des techniques de quantification de la fibrose pour l'examen anatomo-pathologique en transplantation rénale = Recent approaches of quantification of interstitial fibrosis in renal transplantation. *MS. Médecine sciences* 25, n°. 11: 945-950.
- Shah, M B, J E Martin, T J Schroeder, et M R First. 1999. The evaluation of the safety and tolerability of two formulations of cyclosporine: neoral and sandimmune. A meta-analysis. *Transplantation* 67, n°. 11 (Juin 15): 1411-1417.
- Sheikh, Zafar, Rizwan Ahmad, Naila Sheikh, et Rashid Ali. 2007. Enhanced recognition of reactive oxygen species damaged human serum albumin by circulating systemic lupus erythematosus autoantibodies. *Autoimmunity* 40, n°. 7 (Novembre): 512-520. doi:10.1080/08916930701574331.
- Shield, C F, E B Edwards, D B Davies, et O P Daily. 1997. Antilymphocyte induction therapy in cadaver renal transplantation: a retrospective, multicenter United Network for Organ Sharing Study. *Transplantation* 63, n°. 9 (Mai 15): 1257-1263.
- Sis, B, P M Campbell, T Mueller, C Hunter, S M Cockfield, J Cruz, C Meng, D Wishart, K Solez, et P F Halloran. 2007. Transplant glomerulopathy, late antibody-mediated rejection and the ABCD tetrad in kidney allograft biopsies for cause. *American Journal of Transplantation: Official Journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons* 7, n°. 7 (Juillet): 1743-1752. doi:10.1111/j.1600-6143.2007.01836.x.
- Sis, B, M Mengel, M Haas, R B Colvin, P F Halloran, L C Racusen, K Solez, et al. 2010. Banff '09 Meeting Report: Antibody Mediated Graft Deterioration and Implementation of Banff Working Groups. *American Journal of Transplantation: Official Journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons* (Janvier 29). doi:10.1111/j.1600-6143.2009.02987.x.  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20121738>.
- Sis, Banu, Gian S Jhangri, Sakarn Bunnag, Kara Allanach, Bruce Kaplan, et Philip F Halloran. 2009. Endothelial gene expression in kidney transplants with alloantibody indicates antibody-mediated damage despite lack of C4d staining. *American Journal of Transplantation: Official Journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons* 9, n°. 10 (Octobre): 2312-2323. doi:10.1111/j.1600-6143.2009.02761.x.
- Snanoudj, R, F Martinez, R Sberro Soussan, E Thervet, et C Legendre. 2008. [Screening biopsies in kidney transplantation: from subclinical acute rejection to chronic allograft lesions]. *Néphrologie & Thérapeutique* 4 Suppl 3 (Octobre): S192-199. doi:10.1016/S1769-7255(08)74234-2.
- Solez, K, R A Axelsen, H Benediktsson, J F Burdick, A H Cohen, R B Colvin, B P Croker, D Droz, M S Dunnill, et P F Halloran. 1993. International standardization of criteria for the histologic diagnosis of renal allograft rejection: the Banff working classification of kidney transplant pathology. *Kidney International* 44, n°. 2 (Août): 411-422.
- Solez, K, R B Colvin, L C Racusen, M Haas, B Sis, M Mengel, P F Halloran, et al. 2008. Banff 07 classification of renal allograft pathology: updates and future directions. *American Journal of Transplantation: Official Journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant*

- Surgeons* 8, n°. 4 (Avril): 753-760. doi:10.1111/j.1600-6143.2008.02159.x.
- Solez, K, R B Colvin, L C Racusen, B Sis, P F Halloran, P E Birk, P M Campbell, et al. 2007. Banff '05 Meeting Report: differential diagnosis of chronic allograft injury and elimination of chronic allograft nephropathy ('CAN'). *American Journal of Transplantation: Official Journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons* 7, n°. 3 (Mars): 518-526. doi:10.1111/j.1600-6143.2006.01688.x.
- Spies, T, C C Morton, S A Nedospasov, W Fiers, D Pious, et J L Strominger. 1986. Genes for the tumor necrosis factors alpha and beta are linked to the human major histocompatibility complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 83, n°. 22 (Novembre): 8699-8702.
- Süsäl, Caner, et Gerhard Opelz. 2004. Good kidney transplant outcome in recipients with presensitization against HLA class II but not HLA class I. *Human Immunology* 65, n°. 8 (Août): 810-816. doi:10.1016/j.humimm.2004.05.010.
- Sumitran-Karuppan, S, G Tyden, F Reinholt, U Berg, et E Moller. 1997. Hyperacute rejections of two consecutive renal allografts and early loss of the third transplant caused by non-HLA antibodies specific for endothelial cells. *Transplant Immunology* 5, n°. 4 (Décembre): 321-327.
- Sutherland, Scott M, Li Li, Tara K Sigdel, Persis P Wadia, David B Miklos, Atul J Butte, et Minnie M Sarwal. 2009. Protein microarrays identify antibodies to protein kinase Czeta that are associated with a greater risk of allograft loss in pediatric renal transplant recipients. *Kidney International* 76, n°. 12 (Décembre): 1277-1283. doi:10.1038/ki.2009.384.
- Tait, B D, F Hudson, G Brewin, L Cantwell, et R Holdsworth. 2010. Solid phase HLA antibody detection technology - challenges in interpretation. *Tissue Antigens* (Avril) 8. doi:10.1111/j.1399-0039.2010.01486.x. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20403141>.
- Tait, Brian D, Fiona Hudson, Linda Cantwell, Gemma Brewin, Rhonda Holdsworth, Greg Bennett, et Matthew Jose. 2009. Review article: Luminex technology for HLA antibody detection in organ transplantation. *Nephrology (Carlton, Vic.)* 14, n°. 2 (Avril): 247-254. doi:10.1111/j.1440-1797.2008.01074.x.
- Takemoto, Steven K, Adriana Zeevi, Sandy Feng, Robert B Colvin, Stanley Jordan, Jon Kobashigawa, Jerzy Kupiec-Weglinski, et al. 2004. National conference to assess antibody-mediated rejection in solid organ transplantation. *American Journal of Transplantation: Official Journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons* 4, n°. 7 (Juillet): 1033-1041. doi:10.1111/j.1600-6143.2004.00500.x.
- Terasaki, Paul I. 2003. Humoral theory of transplantation. *American Journal of Transplantation: Official Journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons* 3, n°. 6 (Juin): 665-673.
- Thaunat, Olivier, William Hanf, Valérie Dubois, Brigitte McGregor, Gisèle Perrat, Cécile Chauvet, Jean-Louis Touraine, et Emmanuel Morelon. 2009. Chronic humoral rejection mediated by anti-HLA-DP alloantibodies: insights into the role of epitope sharing in donor-specific and non-donor specific alloantibodies generation. *Transplant Immunology* 20, n°. 4 (Mars): 209-211. doi:10.1016/j.trim.2008.12.006.
- Tiller, Thomas, Makoto Tsuiji, Sergey Yurasov, Klara Velinzon, Michel C Nussenzweig, et Hedda Wardemann. 2007. Autoreactivity in human IgG+ memory B cells. *Immunity* 26, n°. 2 (Février): 205-213. doi:10.1016/j.immuni.2007.01.009.

- Touyz, Rhian M. 2005. Molecular and cellular mechanisms in vascular injury in hypertension: role of angiotensin II. *Current Opinion in Nephrology and Hypertension* 14, n°. 2 (Mars): 125-131.
- Uematsu, Satoshi, et Shizuo Akira. 2008. Toll-Like receptors (TLRs) and their ligands. *Handbook of Experimental Pharmacology*, n°. 183: 1-20. doi:10.1007/978-3-540-72167-3\_1.
- Urschel, S, P M Campbell, S R Meyer, I M Larsen, J Nuebel, J Birnbaum, H Netz, et al. 2010. Absence of donor-specific anti-HLA antibodies after ABO-incompatible heart transplantation in infancy: altered immunity or age? *American Journal of Transplantation: Official Journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons* 10, n°. 1 (Janvier): 149-156. doi:10.1111/j.1600-6143.2009.02877.x.
- Vanrenterghem, Y, J P Squiflet, J Forsythe, U Heeman, L Bäckman, D Taube, J M Morales, et al. 1998. Co-administration of tacrolimus and mycophenolate mofetil in cadaveric renal transplant recipients. *Transplantation Proceedings* 30, n°. 4 (Juin): 1290-1291.
- Vitalone, Matthew J, Philip J O'Connell, Moses Wavamunno, Caroline L-S Fung, Jeremy R Chapman, et Brian J Nankivell. 2010. Transcriptome changes of chronic tubulointerstitial damage in early kidney transplantation. *Transplantation* 89, n°. 5 (Mars 15): 537-547. doi:10.1097/TP.0b013e3181ca7389.
- Vongwiwatana, Attapong, Adis Tasanarong, David C Rayner, Anette Melk, et Philip F Halloran. 2005. Epithelial to mesenchymal transition during late deterioration of human kidney transplants: the role of tubular cells in fibrogenesis. *American Journal of Transplantation: Official Journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons* 5, n°. 6 (Juin): 1367-1374. doi:10.1111/j.1600-6143.2005.00843.x.
- Wahrmann, Markus, Markus Exner, Bettina Haidbauer, Martin Schillinger, Heinz Regele, Günther Köröczki, et Georg A Böhmig. 2005. [C4d]FlowPRA screening--a specific assay for selective detection of complement-activating anti-HLA alloantibodies. *Human Immunology* 66, n°. 5 (Mai): 526-534. doi:10.1016/j.humimm.2004.12.007.
- Wavamunno, M D, P J O'Connell, M Vitalone, C L-S Fung, R D M Allen, J R Chapman, et B J Nankivell. 2007a. Transplant glomerulopathy: ultrastructural abnormalities occur early in longitudinal analysis of protocol biopsies. *American Journal of Transplantation: Official Journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons* 7, n°. 12 (Décembre): 2757-2768. doi:10.1111/j.1600-6143.2007.01995.x.
- Worthington, Judith E, Susan Martin, Dalia M Al-Husseini, Philip A Dyer, et Robert W G Johnson. 2003. Posttransplantation production of donor HLA-specific antibodies as a predictor of renal transplant outcome. *Transplantation* 75, n°. 7 (Avril 15): 1034-1040. doi:10.1097/01.TP.0000055833.65192.3B.
- Zhao, Y P, J Q Yang, Y Ge, L A Fan, P Loiseau, et J Colombani. 1993. HLA-DR and -DQB1 genotyping in a Chinese population. *European Journal of Immunogenetics: Official Journal of the British Society for Histocompatibility and Immunogenetics* 20, n°. 4 (Août): 293-297.

## Résumé

Malgré les progrès des immunothérapies, le rejet chronique est un problème majeur de la transplantation rénale. Les causes les plus fréquentes sont la Glomérulopathie du Transplant (GT) et la fibrose interstitielle et atrophie tubulaire (FIAT). La GT est définie par des lésions chroniques associées à des anticorps anti-HLA donneur-spécifiques (DSA) et un dépôt de C4d. La FIAT est une lésion non humorale. Les anticorps anti-HLA de classe II corrèlent avec le rejet chronique. Cependant les isotypes d'IgG diffèrent dans leur capacité à fixer le complément, donc à engendrer du C4d, et ceci a très peu été étudié en transplantation rénale. De plus, des études ont montré que le développement de DSA anti-HLA corrélait avec un développement d'anticorps non HLA.

Le but de notre projet était d'étudier les anticorps de patients greffés afin de trouver des profils d'isotypes d'IgG et d'anticorps non HLA spécifiques de quatre statuts, dont la GT, la FIAT, les patients transplantés ayant un greffon stable (STA) et les patients dialysés (DIA). Les sérum des patients ont été analysés par la technique Luminex Single Antigen Bead, adaptée afin de détecter les isotypes d'IgG anti-HLA DSA. D'autre part, les sérum ont été criblés sur des puces contenant 8000 protéines humaines et comparés entre eux afin d'obtenir des listes de biomarqueurs uniques et spécifiques de chaque statut du greffon.

Aucun isotype d'IgG ne distingue les IFTA des TG, bien que les TG développent plus de DSA à des MFI plus élevées. Cependant, les puces à protéines ont permis de définir des listes de biomarqueurs pour chaque statut du greffon. Ces données pourraient donc aider au diagnostic précoce du statut du greffon.

Although huge improvements have been made in immunotherapies, chronic rejection remains a major problem in the field of kidney transplantation. The leading causes are Transplant Glomerulopathy (TG) and Interstitial Fibrosis and Tubular Atrophy (IFTA). TG is defined by chronic lesions associated with anti-HLA donor-specific antibodies (DSA) and C4d deposits on the graft. IFTA is a non-immune injury. Anti-HLA class II antibodies are correlated to chronic rejection. However, IgG isotypes differ in their ability to bind the complement, thus producing C4d, and this has not been extensively studied. Furthermore, studies have shown that anti-HLA DSA development was correlated with non-HLA antibodies development.

Our project aimed at studying antibodies developed by transplanted patients to define IgG anti-HLA isotypes and non-HLA antibodies profiles specific of each of four kidney status including TG, IFTA, transplanted patients with a stable function (STA) and dialysis patients (DIA). Sera of all patients have been analyzed on single antigen bead with the modified luminex technology to detect anti-HLA DSA isotypes. Sera have also been screened on protein arrays to obtain unique biomarkers specific of each kidney status.

No IgG isotype differentiates IFTA from TG patients, though the last develop more DSA at higher MFI values. However, protein arrays led us to obtain lists of biomarkers for each kidney status. These data could help getting an early diagnosis of kidney status.